

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)



**Estudio de antiinflamatorios naturales
para el diseño de alimentos
de uso específico para la salud**

**Study of natural anti-inflammatory compounds
to design specific food
with beneficial health properties**

Elena María Arranz Gutiérrez

Tesis doctoral

Madrid, diciembre 2013



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CIAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA
Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

**Estudio de antiinflamatorios naturales
para el diseño de alimentos
de uso específico para la salud**

**Study of natural anti-inflammatory compounds
to design specific food
with beneficial health properties**

Memoria presentada por:

Elena María Arranz Gutiérrez

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Mención Internacional**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Susana Santoyo Díez

Dr. Guillermo Reglero Rada

(Universidad Autónoma de Madrid)

DÑA. SUSANA SANTOYO DIEZ, PROFESORA TITULAR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y D. GUILLERMO REGLERO RADA, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado "**Estudio de antiinflamatorios naturales para el diseño de alimentos de uso específico para la salud**" (*"Study of natural anti-inflammatory compounds to design specific food with beneficial health properties"*), y que constituye la memoria que presenta Dña. Elena M^a Arranz Gutiérrez para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) y la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste firman el presente informe en Madrid a 31 de octubre de 2013.

Fdo. Dña. Susana Santoyo Diez

Fdo. D. Guillermo Reglero Rada

A mis padres

**“Si consigo ver más lejos es
porque he conseguido auparme
a hombros de gigantes”**

Isaac Newton

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Guillermo Reglero el haberme brindado la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora y formarme profesionalmente en el Grupo de Investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la UAM, así como por dirigir esta Tesis Doctoral. Muchísimas gracias por haber confiado en mí, tu apoyo, orientación y disponibilidad durante estos años.

A la Dra. Susana Santoyo, directora de la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación y además codirectora de esta tesis. Gracias por tu extraordinario esfuerzo, compromiso y dedicación para conseguir encauzar este trabajo y sobre todo, haberme hecho crecer como profesional y como persona. Ya conoces el balance y eres parte fundamental del mismo, sencillamente, gracias por todo Susana.

Por supuesto agradecer a todo el personal del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) por su acogida y especialmente a su directora, la Dra M^a Victoria Moreno, por las facilidades que me ha ofrecido para el desarrollo de este trabajo.

Del mismo modo, quiero agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) que ha financiado, en parte, esta etapa.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Laura Jaime, por ser una de las piezas imprescindibles para terminar este puzzle y ante todo, compartir tan buenos momentos, dentro y fuera del ámbito científico (para cuando unos...).

También quiero agradecer muy especialmente a las Dras. Mónica Rodríguez y Tiziana Fornari, porque vuestro trabajo a lo largo de estos años ha sido fundamental para que se puedan leer estas líneas, gracias por vuestra ayuda incondicional, paciencia y transmitirme tanto entusiasmo cada día.

A la Dra. Montserrat González, me siento orgullosa de conocer a una persona admirable.

Al resto de profesores del Departamento y en especial a Marín, Cristina y Chesco, por haberme acompañado estos años, haberme transmitido sus conocimientos y por su trato.

Al Grupo de Investigación de *Foodomics* y muy especialmente a Jose A. Mendiola, porque has estado desde el inicio hasta ahora compartiendo tantos momentos, me has enseñado mucho de lo que ahora sé, un gran compañero y mejor persona.

Al personal del Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal y en especial a Gema de la Peña por su ayuda, disponibilidad y trabajo aportado a lo largo de estos años.

Indudablemente quisiera expresar mi agradecimiento por la acogida que tuve durante mi estancia en Wageningen, gracias Cristina por haberme ayudado a conocer ese sorprendente rincón de Holanda. *Specially, I would like to thank my supervisors, Dr. Harry Wichers and Jurriaan Mess, for giving me the opportunity to work in your lab. During my stay I had the opportunity to meet incredible lab mates, some of them great friends, Glenda, Mercedes, Book, Eva, Gianni, Javi, Amarh, Dimitry, Fitura, Pieter... you know, it was more than OK!* Y por supuesto a mis amigos *Cialeros* en Holanda, Guzmán y Marta, juntos descubrimos *chinchetazo* a *chinchetazo* un país increíble, super *team*.

También quiero expresar mi sincero agradecimiento por la acogida que tuve en la segunda de mis estancias en este periodo, en Guelph, gracias a Mónica y Elena Molina por ponerme en contacto con el grupo. *In particular my advisor, Dr. Milena Corredig, I really appreciate your help, time, patient and assistance. As well as my dears Anilda and Eleana, forever grateful, thanks for all!. Of course, I don't forget you, Pauline, Somaye, Heba, Jonathan, Laís and the rest of my lab mates, you made my days incredible.* Asimismo, gracias a la comunidad hispana por enseñarme otra versión de Canadá, especialmente a Rocío, Eva, Romina y Ángela. *People, see you really soon!.*

Y volviendo a casa, gracias a mis compañeros de laboratorio, tanto dentro como fuera de él formamos una gran familia. Empezamos por los más cercanos, Mayka, Juanan y Ana, chicos cuánto hemos vivido juntos para llegar hasta aquí, de todo se aprende. A mis chicas, Ali, María y Laila, por ser como sois, ¡os quiero!. Y por supuesto al resto de los que

han compartido conmigo este camino desde el inicio, algunos que se quedaron a la mitad y a los nuevos: Gonzalo, Erika, David, Inés, Dani, Víctor, Óscar, Pilar, Elvis, Ana María y Alba. Ah, creo que se me está olvidando alguien... es verdad, pensado en las cualidades de una amiga..., sí, las cumples todas, Bea gracias.

Sin duda gracias a todos los amigos que se han cruzado en mi vida, entre ellos a quienes aprendieron conmigo a creer en la ciencia desde la Facultad de Biología en la UCM, especialmente a Elena, Sara y Montse.

Por supuesto también quiero acordarme de la gente de mi pueblo, Riaguas de San Bartolomé, mi pulmón y escapatoria de fin de semana en el nordeste de Segovia. Y especialmente de Esther, mi apoyo más incondicional, valoro muchísimo que intentes entender lo que hago; de Cris y de Silvia, gracias por estar siempre que os necesito.

Por último, gracias a mi familia, por vuestro apoyo y porque siempre os interesáis por lo que estoy haciendo, especialmente a Mari, porque estuviste en el inicio de este camino. A mi hermano y Elena, por entenderme, orientarme y ayudarme y al pequeñín, Hugo, porque desde que has llegado nos has hecho a todos más felices, pronto te contaré, cuando puedas leer estas líneas, dónde estaba tu tía mientras llegabas al mundo. Un recuerdo especial merecen dos de las personas que más orgullosas estarían de este trabajo, mis abuelas, Felisa y Nemesia, dos ejemplos de vidas. Y por supuesto, este trabajo está dedicado a mis padres por hacer de mí una mejor persona cada día, porque soy lo que soy gracias a vosotros, gracias por enseñarme a valorar lo que uno consigue con su esfuerzo y hacer que mi vida sea tan feliz.

ÍNDICE GENERAL

Lista de abreviaturas.....	I
Resumen/Summary	V
Objetivos/Objectives.....	XI
Plan de trabajo	XVII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Alimentos de uso específico para la salud	3
1.1.1 Tipos de alimentos de uso específico para la salud	6
1.1.2 Diseño de alimentos de uso específico para la salud	7
1.2 El proceso inflamatorio y su implicación en diversas patologías	12
1.2.1 Principales mediadores implicados en el proceso inflamatorio	17
1.2.2 Determinación del proceso inflamatorio	23
1.3 Fuentes naturales de ingredientes antiinflamatorios.....	28
1.3.1 Plantas labiadas.....	29
1.4 Extracción de ingredientes alimentarios funcionales mediante tecnologías limpias.....	38
1.4.1 Extracción con fluidos supercríticos.....	39
1.4.2 Extracción con líquidos presurizados	43
2 MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1 Materias primas.....	49
2.2 Extracción con fluidos supercríticos.....	49
2.3 Extracción con líquidos presurizados.....	52
2.4 Determinación de la actividad antioxidante.....	53
2.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria.....	55
2.5.1 Cultivos celulares	55
2.5.2 Ensayos de citotoxicidad	55
2.5.3 Medida de la actividad antiinflamatoria.....	56
2.5.3.1 Ensayo ELISA para la cuantificación de citoquinas	57
2.5.3.2 Cuantificación de la expresión génica	58
2.6 Caracterización química	59
2.6.1 Análisis mediante cromatografía de líquidos.....	59

2.6.2	Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	60
2.7	Medida de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero	61
2.7.1	Medida de la absorción intestinal <i>in vitro</i>	61
2.7.2	Determinación de la cantidad de ácido carnósico y carnosol en las fracciones biodisponible y bioaccesible	65
2.7.3	Medida de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible.....	67
2.8	Formulación del extracto supercrítico de romero para su incorporación a alimentos de uso específico para la salud con propiedades antiinflamatorias	68
2.8.1	Incorporación del extracto de romero a una matriz alimentaria de origen lácteo.....	68
2.8.2	Biodisponibilidad <i>in vitro</i>	69
2.8.2.1	Digestión <i>in vitro</i>	69
2.8.2.2	Absorción intestinal <i>in vitro</i>	71
2.8.2.3	Determinación de la cantidad de ácido carnósico y carnosol de los productos obtenidos tras cada etapa del proceso de digestión y absorción.	71
2.9	Tratamiento estadístico.....	72
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
3.1	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos supercríticos procedentes de distintas plantas aromáticas.....	75
3.1.1	Medida de la actividad antiinflamatoria de los distintos extractos supercríticos.....	75
3.1.1.1	Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS.....	76
3.1.1.2	Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox.....	82
3.1.2	Relación de la composición química de los extractos supercríticos con su actividad antiinflamatoria.	87
3.1.3	Influencia del tiempo de tratamiento en la actividad antiinflamatoria de los extractos supercríticos de albahaca, mejorana y romero.....	93
3.2	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos mediante extracción con líquidos presurizados	97
3.2.1	Medida de la actividad antiinflamatoria.....	98

3.2.1.1 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS.....	98
3.2.1.2 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox.....	101
3.2.2 Relación de la composición química de los extractos obtenidos por PLE con su actividad antiinflamatoria.....	103
3.2.3 Influencia del tiempo de tratamiento en la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero	107
3.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos supercríticos de romero obtenidos en distintas condiciones.....	111
3.3.1 Extracción y caracterización química de los extractos supercríticos de romero.....	111
3.3.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria.....	114
3.3.2.1 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS.....	114
3.3.2.2 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox.....	118
3.3.3 Relación del contenido en ácido carnósico y carnosol con la actividad antiinflamatoria de los extractos.....	120
3.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero.	123
3.4.1 Ensayo de absorción <i>in vitro</i>	123
3.4.2 Actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto de romero.....	129
3.5 Formulación del extracto supercrítico de romero para su incorporación a alimentos de uso específico para la salud con propiedades antiinflamatorias	132
3.5.1 Etapa de digestión <i>in vitro</i>	133
3.5.2 Etapa de absorción <i>in vitro</i>	136
4 CONCLUSIONES.....	141
4.1 Conclusions.....	146
BIBLIOGRAFÍA.....	149

Lista de abreviaturas

ALP	Enzima fosfatasa alcalina
AP-1	Factor de transcripción de la proteína activadora 1
COX	Ciclooxigenasa
EGCG	Epigallocatequin galato
ELISA	Enzimoinmunoensayo
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GRAS	Reconocidos generalmente como seguros
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos con detector de haz de diodos
HUVEC	Células humanas endoteliales de la vena umbilical
ICAM-1	Proteína transmembrana de adhesión intercelular
IκB	Proteína inhibidora del NF- κ B
IκK	Quinasa del factor I κ B
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	Lipopolisacárido
MDA	Malondialdehído
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κ B
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PMA	12-miristato, 13-acetato de forbol
PGE	Prostaglandina E
RAW	Línea celular de macrófagos de ratón con leucemia
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TEAC	Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox
TEER	Potencial transmembrana
THP-1	Línea celular de monocitos de leucemia mieloide aguda
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α

UHPLC-MS/MS	Cromatografía de ultra alta presión acoplada a espectrometría de masas en tándem
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen/Summary

Resumen

En la presente Memoria se recoge el trabajo realizado y los resultados más relevantes obtenidos durante la investigación llevada a cabo para optar al título de Doctor. El objetivo ha sido contribuir al campo del desarrollo de productos de uso específico para la salud, estudiando las propiedades de extractos naturales obtenidos mediante tecnologías avanzadas de aislamiento y concentración.

Se han obtenido extractos de diversas especies de plantas labiadas, empleando las tecnologías de fluidos supercríticos y líquidos presurizados, y se ha determinado su actividad antiinflamatoria *in vitro*. Para ello, se han usado dos modelos de inflamación, uno donde los macrófagos humanos se activan con lipopolisacárido bacteriano y otro con lipoproteínas de baja densidad oxidadas. Los extractos procedentes de todas las especies presentaron actividad antiinflamatoria, ya que han reducido tanto la secreción como la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Sin embargo, de todos los extractos ensayados, el que ha presentado una mayor actividad antiinflamatoria ha sido el extracto supercrítico de romero, relacionándose esta actividad con su contenido en ácido carnósico y carnosol principalmente, además de con la presencia de 1,8-cineol y alcanfor.

La incorporación de un 5% de etanol durante el proceso de extracción supercrítica de romero, ha incrementado el contenido en ácido carnósico y carnosol del extracto, lo que se traduce en una mayor actividad antiinflamatoria del mismo. La fracción biodisponible de este extracto de romero, determinada *in vitro* mediante células Caco-2, presenta un 25% del ácido carnósico y un 3% del carnosol presentes en el extracto de partida, tras 12 horas de ensayo. Asimismo, esta fracción biodisponible también posee una importante actividad antiinflamatoria, que no se puede atribuir exclusivamente al ácido carnósico y al carnosol.

Para evitar posibles degradaciones del extracto de romero durante el proceso de digestión y con el fin de aumentar su biodisponibilidad, se ha encapsulado en micelas de caseínas. Los resultados han indicado que esta encapsulación protege al ácido carnósico presente en el extracto de su oxidación durante el proceso de digestión y aumenta su biodisponibilidad tras los ensayos de absorción, ya que solo son necesarias 4 horas para detectar ácido carnósico en la fracción biodisponible.

Por todo ello, ha quedado demostrado que el extracto de romero supercrítico puede emplearse como un ingrediente funcional, incorporándolo a formulaciones biodisponibles idóneas para obtener alimentos de uso específico para la salud, donde el extracto de romero aporte su elevada actividad antiinflamatoria.

Summary

This report describes the scientific methodology and the most relevant results obtained during the experimental training period required to obtain the PhD degree. The aim of the work was to investigate the potential development of specific products with beneficial health properties by studying the biological properties of natural extracts obtained using advanced technologies for isolation and concentration of particular compounds.

Specific plant extracts from different *Lamiaceae* sp. species were obtained using supercritical fluid technologies and pressurized solvents. In order to study their *in vitro* anti-inflammatory activities, two inflammation models were used: in one of them human macrophages activated with bacterial lipopolysaccharides were utilized, the other used oxidized low density lipoproteins. The extracts from all the tested species showed anti-inflammatory activity because they reduced both secretion and gene expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. However, the supercritical extract obtained from rosemary showed the highest anti-inflammatory activity mainly due to its carnosic acid and carnosol content and the presence of 1,8-cineole and camphor.

Addition of 5% (v/v) ethanol as co-solvent during the supercritical extraction process, increased carnosic acid and carnosol levels in the obtained rosemary extract resulting in a higher anti-inflammatory activity than extracts obtained without ethanol. The bioavailable fraction of the rosemary extract obtained with ethanol, determined by *in vitro* Caco-2 transport assays, contained 25% carnosic acid and 3% carnosol of the initially applied extract after 12 h incubation. This bioavailable fraction also showed an important anti-inflammatory activity that might be not exclusively attributed to carnosic acid and carnosol.

In order to avoid the extract degradation during digestion and to increase its bioavailability, the rosemary extract was encapsulated in casein micelles. Results indicated that this encapsulation process protected the carnosic acid of the extract from oxidation during the digestion process. Absorption tests confirmed that encapsulation also increased its bioavailability because after only 4 h carnosic acid was detected in the bioavailable fraction.

Therefore, it can be concluded that the supercritical rosemary extract can be used as a functional ingredient to be incorporated into bioavailable formulations suitable to design foodstuffs with specific beneficial health properties because of its high anti-inflammatory activities.

Objetivos/Objectives

Objetivos

Con el presente trabajo de Tesis Doctoral se pretende contribuir al campo del desarrollo de productos de uso específico para la salud, estudiando las propiedades de extractos naturales obtenidos mediante tecnologías avanzadas de aislamiento y concentración.

El objetivo general de la investigación ha sido obtener ingredientes alimentarios con actividad antiinflamatoria y alta biodisponibilidad, caracterizados y formulados adecuadamente para ser aplicados al diseño de alimentos de uso específico para la salud.

Para la consecución del objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Identificación de la materia prima más adecuada y del procedimiento idóneo para la obtención de extractos naturales antiinflamatorios útiles como ingredientes bioactivos de uso alimentario.
- 2.- Caracterización de los componentes de los extractos que determinan su actividad antiinflamatoria.
- 3.- Elección del procedimiento óptimo para la producción de extractos naturales con alta actividad antiinflamatoria.
- 4.- Estudio de la influencia de la composición de los extractos naturales de alta actividad antiinflamatoria en su biodisponibilidad.
- 5.- Formulación de los extractos de alta actividad antiinflamatoria para mejorar su biodisponibilidad y adecuar sus propiedades para la incorporación a matrices alimentarias.

Objectives

This PhD Thesis is intended to contribute to the field of investigate the potential development of specific products with beneficial health properties by studying the biological properties of natural extracts obtained using advanced technologies for isolation and concentration of particular compounds.

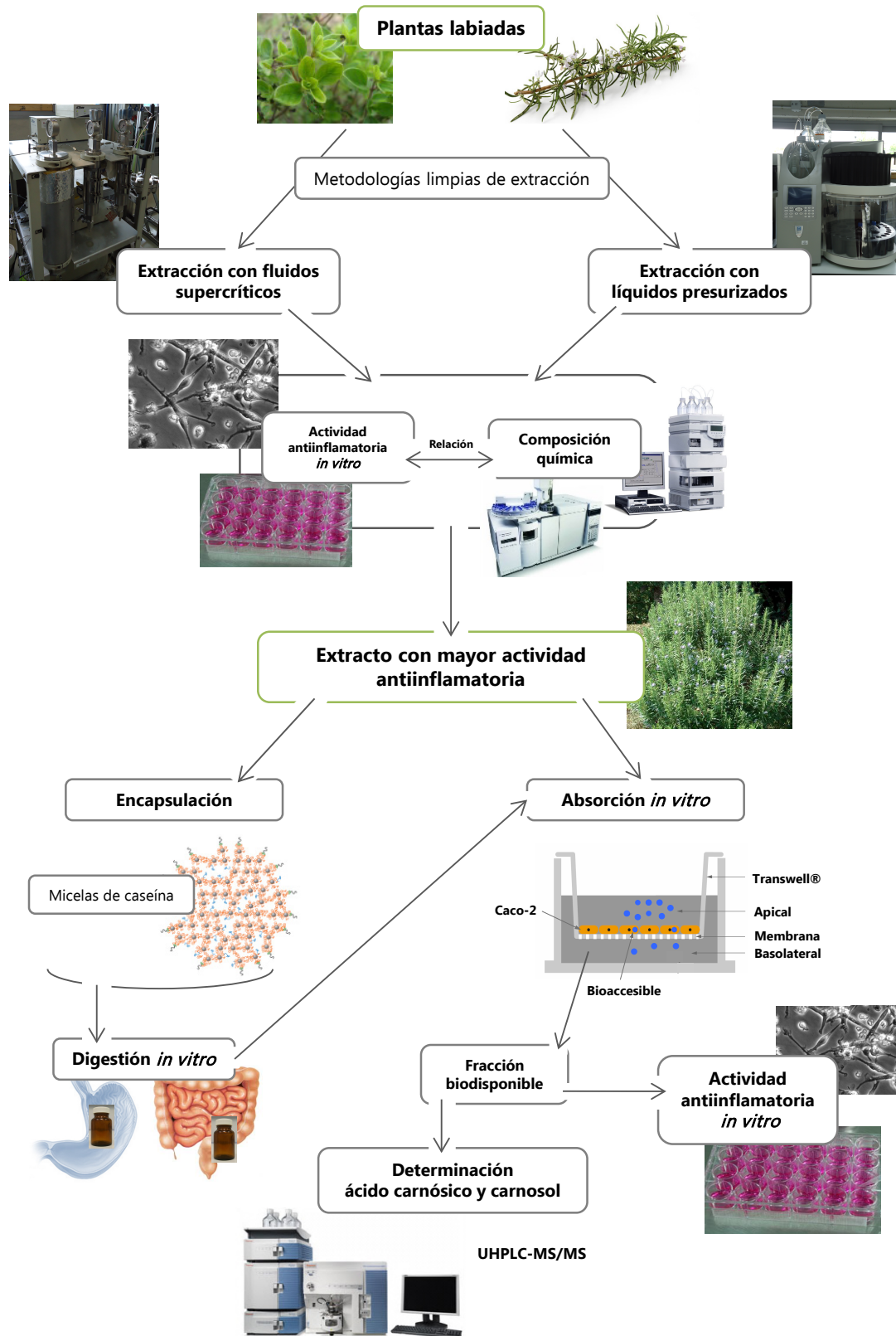
The main objective of this work was to obtain bioactive ingredients with anti-inflammatory activity and high bioavailability, to study their chemical composition and their biological activity to formulate new foodstuffs with specific beneficial health properties.

Therefore, the objectives studied in this research were:

- 1.- Identifying the most suitable raw material and proper method to obtain anti-inflammatory natural extracts to be used as food-grade bioactive ingredients.
- 2.- Characterization of the extract compounds responsible for their anti-inflammatory activity.
- 3.- Selection of the optimal procedure to obtain natural extracts with high anti-inflammatory activity.
- 4.- Study of the bioavailability of the natural extracts with high anti-inflammatory activity depending on their composition.
- 5.- Formulation of extracts with high anti-inflammatory activity to enhance their bioavailability and to facilitate their incorporation into food matrices.

Plan de trabajo

El plan de trabajo que se ha seguido en la presente investigación consta de varias etapas, según se presenta en la siguiente figura:



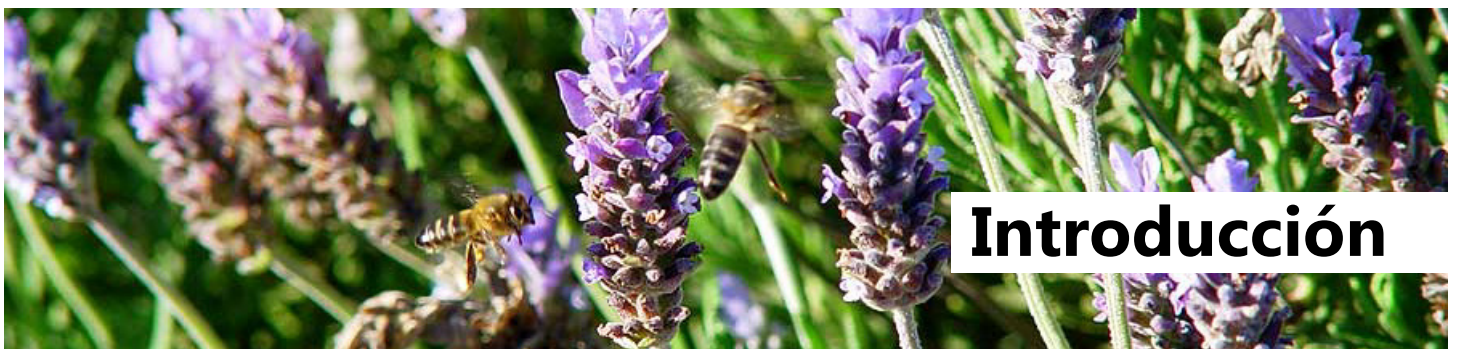
En primer lugar, se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los extractos obtenidos por tecnología de fluidos supercríticos y líquidos presurizados, a partir de varias plantas labiadas, con el fin de seleccionar la técnica de extracción y la especie más adecuada para obtener extractos con alta actividad antiinflamatoria.

A continuación, se ha estudiado la relación entre la composición de los extractos más activos y su actividad antiinflamatoria, determinando los compuestos en los que se basa dicha actividad. Se ha puesto especial énfasis en la evaluación de la relación existente entre la composición de dos extractos supercríticos de romero de actividad destacada, obtenidos en distintas condiciones, y su actividad antiinflamatoria. Concretamente, este estudio se ha focalizado en la relación entre dicha actividad y el contenido de los extractos en ácido carnósico y carnosol.

La determinación de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero más activo ha sido considerada unas de las tareas esenciales dentro del plan de trabajo. Ha consistido básicamente en el estudio de la influencia del ácido carnósico y el carnosol en la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible.

Finalmente, se ha estudiado la formulación del extracto con mayor actividad antiinflamatoria para mejorar su biodisponibilidad tras el proceso de digestión *in vitro* y su adecuación para ser incorporado a matrices alimentarias con vistas al diseño de alimentos de uso específico para la salud.

1



Introducción

1.1 Alimentos de uso específico para la salud

Existen numerosas evidencias científicas que demuestran la existencia de compuestos con efectos beneficiosos para la salud en muchos de los alimentos que ingerimos habitualmente, como son las frutas y verduras, el pescado, los productos lácteos y los cereales, entre otros. A pesar de esto, los cambios en los hábitos de vida de la población están impidiendo, en muchas ocasiones, cumplir con las pautas de consumo recomendadas, aumentando así el riesgo de padecer ciertas enfermedades. En este contexto surgen los denominados alimentos de uso específico para la salud, alimentos que además de satisfacer las necesidades nutricionales, aporten beneficios o reduzcan el riesgo de sufrir ciertas enfermedades.

Hoy en día se ha superado el concepto de dieta adecuada como aquella concebida para la supervivencia y la calidad de vida. Actualmente se busca proporcionar salud y reducir el riesgo de padecer enfermedades. Por tanto, el concepto de "nutrición adecuada" se está sustituyendo por el de "nutrición óptima", y se habla de los alimentos de uso específico para la salud y otras denominaciones análogas (alimentos funcionales o alimentos específicos que promocionan la salud), poniendo de manifiesto que algunos puedan tener una acción beneficiosa que va más allá de sus efectos nutricionales básicos. En palabras del profesor F. Grande Covián: *"El hombre primero quiso comer para sobrevivir; luego quiso comer bien e incorporó la gastronomía a su mundo cultural. Ahora, además, quiere comer salud"*.

El interés por los alimentos diseñados específicamente para contribuir a mejorar algún aspecto concreto de la salud tuvo su origen en Japón durante la década de los años 80, como una medida de mejora de la salud de la población, castigada por los efectos de la II Guerra Mundial, y el rápido incremento en los costes del sistema de salud (Arai, 1996). En el año 1984 se utilizó por primera vez en Japón el término alimento funcional; el Ministerio de Educación impulsó un proyecto nacional sobre alimentos funcionales para fomentar su desarrollo. Sin embargo, tuvieron que transcurrir unos años, hasta 1991, para que el Ministerio japonés de Salud y Bienestar emitiera un decreto en que se aprobara la denominación de los alimentos de uso específico para la salud ("*Foods for Special Health Use*" (FOSHU)). FOSHU incluye a aquellos alimentos que se pueden usar para mejorar la

salud de las personas y cuyo efecto específico sobre ellas se puede alegar como un valor añadido (Ohama y col., 2006).

En otras zonas del mundo, como Europa y América del Norte, el interés por los alimentos de uso específico para la salud surgió a partir de la iniciativa del gobierno japonés y de las evidencias científicas en el ámbito del binomio alimentación y salud. Concretamente, en Estados Unidos (EEUU) este tipo de alimentos surgieron por la necesidad de equilibrar dietas poco saludables, con un alto consumo de grasas saturadas y bajo en vitaminas y fibra. En Europa, durante la segunda mitad de los años 90, dentro de los IV y V Programa Marco, un grupo de trabajo coordinado por el *International Life Science Institute* (ILSI) promovió una comisión de acción concertada para estimular el estudio de este tipo de alimentos, denominada *Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe* (FUFOSE). De esta Acción Concertada surgió la primera definición de alimento funcional aceptada en Europa con carácter general: "aquel alimento que aporta efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, más allá de los efectos nutricionales, y que van encaminados a mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o reducir el riesgo a padecer ciertas enfermedades". Asimismo establecieron los requisitos que deben cumplir este tipo de alimentos (Diplock y col., 1999):

- a) Deben de ser consumidos habitual o diariamente como parte de la dieta normal.
- b) Deben estar constituidos por ingredientes naturales que no estén presentes en el alimento original o bien que se encuentren a una concentración mayor a la que existen en el alimento.
- c) Los efectos beneficiosos que aportan deben de estar demostrados científicamente y han de ser distintos a los únicamente nutritivos.
- d) Deben además mejorar el estado de salud del individuo, su calidad de vida y/o disminuir el riesgo de padecer ciertas enfermedades.
- e) Por último, los efectos que aportan deben de estar autorizados.

Durante los primeros años de comercialización de los alimentos de uso específico para la salud existía un vacío legal en cuanto a su etiquetado, incluyéndose reivindicaciones o alegaciones de salud en muchos casos ambiguas y sin pruebas científicas demostrables. En el año 1997, el *Codex Alimentarius* (CAC/GL 23-1997) adoptó unas directrices generales sobre declaraciones de propiedades saludables, modificadas en 2004 y enmendadas por última vez en 2012. Así, definieron que las declaraciones de propiedades saludables deberían autorizarse si cumplen una serie de condiciones, entre las que se encuentran: un sustento científico adecuado, que las propiedades que se indican sean aceptadas por la autoridad competente del país donde se comercializan o que el beneficio alegado proceda del consumo de una cantidad razonable del alimento en el contexto de una dieta saludable (FAO, 2013).

Sin embargo, en Europa no fue hasta el año 2003 cuando se abordó un proyecto de reglamento regulador a las declaraciones sobre propiedades nutritivas y saludables de los alimentos, incluidos los complementos alimenticios. Esta propuesta de reglamento afrontaba el aportar seguridad jurídica, precisando las condiciones de utilización de las declaraciones sobre propiedades nutritivas y saludables de los alimentos (EC, 2003). A finales de 2006, y tras varias modificaciones, la Unión Europea aprobó un reglamento definitivo (Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006, con fecha de aplicación de todos los estados miembros desde el 1 de julio de 2007) que afectaba a la comunicación publicitaria y etiquetado de los mismos (CE, 2006). La mayor aportación de este reglamento consiste en la obligación de que toda alegación presente en el etiquetado deberá estar provista de la evidencia científica que la justifique. En dicho reglamento se reconoce a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como el organismo de evaluación de las bases científicas sobre las que se pretendan sustentar las alegaciones.

En España, las competencias de eliminación o rectificación de la publicidad referente a las alegaciones nutricionales son competencia de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), un organismo autónomo adscrito al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad cuya misión es garantizar el más alto grado de seguridad alimentaria, coordinando las actuaciones de las administraciones públicas españolas competentes en materia de seguridad alimentaria y nutrición (BOE, 2006).

El auge de los alimentos de uso específico para la salud representa una de las áreas de mayor interés en la investigación e innovación de la industria agro-alimentaria. Concretamente en España el actual Plan Estatal de Investigación Científica Técnica y de Innovación (2013-2016) incluye en el Programa Estatal de I+D+i orientada a los retos de la sociedad, el reto en seguridad y calidad alimentaria; actividad agraria productiva y sostenible, sostenibilidad de recursos naturales, investigación marina y marítima, donde una de sus prioridades es aumentar la calidad y la seguridad de los alimentos y nuevos productos alimenticios, integrando el desarrollo de alimentos seguros, nuevos alimentos funcionales, nutraceuticos y otros adaptados al mercado y técnicas para la normalización y la certificación (MINECO, 2013).

1.1.1 Tipos de alimentos de uso específico para la salud

Bajo la denominación de alimentos de uso específico para la salud se engloban tres tipos de productos, los alimentos funcionales, los dietéticos y los complementos alimenticios.

- *Alimentos funcionales*: aquellos alimentos a los que se han añadido uno o varios ingredientes con actividad biológica, que no se encuentran en el alimento en el que se incorporan o si lo están es en muy poca cantidad y que afecta de modo positivo a la prevención o a la reducción de los síntomas de ciertas enfermedades como las enfermedades crónicas con base inflamatoria, neurodegenerativas o tumorales (Barberá Mateos y Marcos, 2008).
- *Dietéticos*: alimentos destinados a una alimentación especial, en determinadas circunstancias patológicas o fisiológicas (Barberá Mateos y Marcos, 2008).
- *Complementos alimenticios*: productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias (BOE, 2009).

1.1.2 Diseño de alimentos de uso específico para la salud

El diseño de nuevos alimentos de uso específico para la salud y dentro de ellos el de los alimentos funcionales, es una de las áreas de mayor interés en el campo de la investigación e innovación alimentaria (Annunziata y Vecchio, 2011). Una idea de la continua investigación en este campo la aporta el número de artículos que aparecen en el buscador *ISI Web of Knowledge* tras introducir los términos *functional AND food*, más de 56000 y de los cuales sólo al año 2013 corresponden más de 2600 (septiembre de 2013). Esta extensa investigación se traduce no sólo en el número de artículos, sino que existe una transferencia de ese conocimiento a la industria y por ello, cada año se incrementa el número de este tipo de productos en el mercado, existiendo actualmente en España más de 200 referencias comercializadas (Arias-Aranda y Romerosa-Martínez, 2010). Sin embargo, el coste del desarrollo de un producto con estas características se estima entre 1 y 2 millones de dólares, sin incluir los gastos de marketing necesarios para su comercialización, que suelen superar esta cifra (Siró y col., 2008). A pesar del elevado, pero necesario, coste de su desarrollo, se estima que en España en el año 2025 este tipo de productos represente cerca de 40% del mercado alimentario (Monar, 2007).

En este sentido, en los últimos años, el mercado de este tipo de alimentos está dominado por los productos probióticos en zonas como Japón y Europa. Los principales mercados de productos lácteos probióticos son Escandinavia, Países Bajos, Suiza y Croacia, seguidos de países como Francia, Grecia y España que se consideran mercados emergentes en el consumo de este tipo de productos (Mäkinen-Aakula, 2006). Los alimentos prebióticos, son otro de los grupos de alimentos de uso específico para la salud que, actualmente, más se encuentran en el mercado. Dentro de los ingredientes que se incorporan, los más habituales son los fructo-oligosacáridos (FOS), la inulina, los isomalto-oligosacáridos (IMO), la polidextrosa, la lactulosa y el almidón (Gibson, 2004). Asimismo, las bebidas enriquecidas con vitaminas y otros ingredientes funcionales se encuentran también de forma habitual en el mercado. Normalmente se incorporan vitaminas como A, C o E, soja o calcio (Keller, 2006). En la actualidad, son muy populares las bebidas lácteas que ayudan a reducir el colesterol mediante la incorporación de esteroides vegetales. También, los ácidos grasos poliinsaturados se están incorporando de forma habitual en diversos productos. Un ejemplo son los productos cárnicos en los que se incorpora omega-3 (Reglero y col., 2004).

La consecución del diseño de un alimento de uso específico para la salud requiere el planteamiento de unos objetivos a cumplir por medio de un conjunto de especificaciones y requisitos, siendo necesarias una serie de especificaciones técnicas de producto, en cuanto a formulación, ingredientes, parámetros de calidad físico-químicos, microbiológicos o reológicos y especificaciones comerciales, distribución, condiciones de uso y consumo, presentación e imagen. En cuanto a los requisitos se centran en asegurar el control de la calidad del producto, los procedimientos de producción, respecto a las operaciones básicas a realizar y las condiciones de las mismas y una evaluación y validación del producto previa a su puesta en el mercado. Además de los requisitos fundamentales de beneficios para la salud, asociados a su valor nutricional, sus características saludables o la disminución del riesgo de padecer enfermedades (Jones y Jew, 2007; Siró y col., 2008).

En el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo se indica específicamente la necesidad de demostrar científicamente los efectos nutricionales o fisiológicos beneficiosos de un producto alimenticio antes de incluir declaraciones relativas a sus propiedades saludables, siendo verificados sus efectos por la autoridad competente previamente a su aprobación, basados en datos científicos generalmente aceptados en lo que se refiere a la relación entre la dieta y la salud.

Con el objetivo de cumplir con esta normativa, son varios los estudios previos a realizar, mostrándose algunos de ellos, a modo de ejemplo, en la figura 1. En este sentido, para la obtención de ingredientes bioactivos es necesario, en un primer momento, el diseño de procesos de extracción adecuados dependiendo del tipo de ingrediente. Una vez obtenido el ingrediente funcional es necesaria su caracterización química y el estudio de su actividad biológica *in vitro*, determinando también su biodisponibilidad, ya sea solo o incluido en una matriz alimentaria. Tras conocer la biodisponibilidad, comienza la etapa en la que se optimiza la aceptabilidad, la calidad y la seguridad del alimento. A continuación, se inician los estudios preclínicos en animales de experimentación y posteriormente los estudios clínicos, incluyendo ensayos de proteómica y metabolómica. Tras finalizar todas las etapas, se llega a la consecución del objetivo inicial, el desarrollo de un alimento de uso específico para la salud.

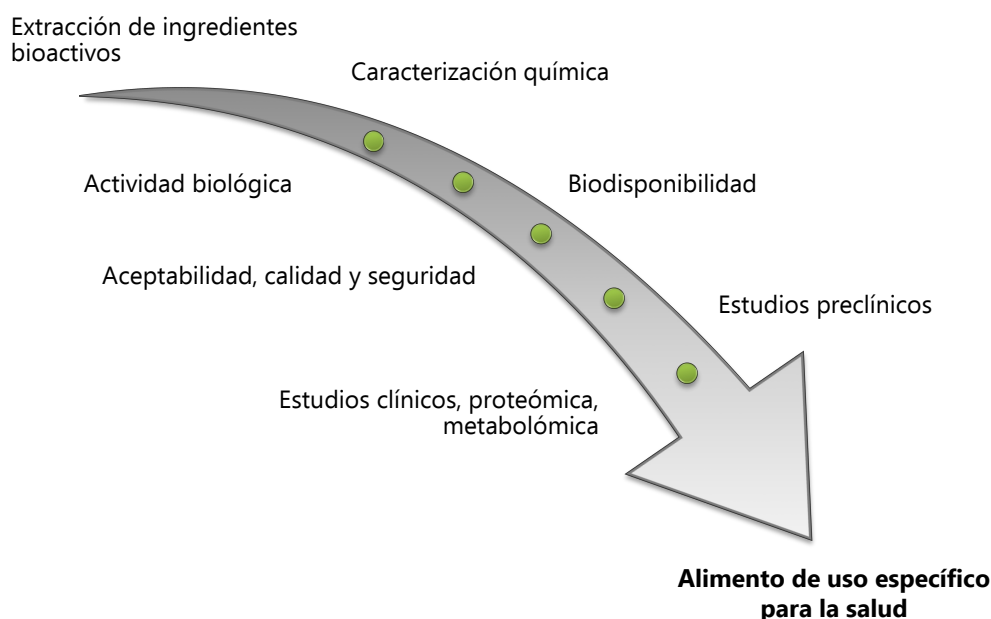


Figura 1: Ejemplo de estudios previos a realizar para el diseño de un alimento de uso específico para la salud.

Sin embargo, en el diseño de un alimento de uso específico para la salud nos podemos encontrar que, en muchas ocasiones, los ingredientes funcionales que se introducen en las matrices alimentarias pueden sufrir un deterioro durante su almacenamiento o a lo largo del paso por el tracto intestinal, limitando por ello su actividad. Asimismo, el carácter hidrofóbico de algunos de los ingredientes funcionales más empleados puede limitar su biodisponibilidad (Fang y Bhandari, 2010). En la actualidad, la industria alimentaria está volcada en el diseño de formulaciones que puedan proteger y mejorar la biodisponibilidad de estos ingredientes, empleando para ello materiales de grado alimentario o reconocidos como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Entre los materiales más utilizados se encuentran polisacáridos procedentes de plantas, como pectinas (Díaz-Rojas y col., 2004), carragenanos (Shi y col., 2013) o goma arábiga (Kaushik y Roos, 2007) y de microorganismos, como dextranos que pueden junto con caseínas formar copolímeros para encapsular β -caroteno (Pan y col., 2007). Asimismo, son utilizadas habitualmente proteínas procedentes de alimentos, como las caseínas, bien solas (Guri y col., 2013) o junto con otros materiales, como se ha indicado, proteínas de soja (Nesterenko y col., 2012) o gelatina (Nakagawa y Nagao, 2012). Para la estabilización de las formulaciones suelen emplearse emulsionantes, destacando el Tween (Ziani y col., 2012) o los monoglicéridos (Goldstein y Seetharaman, 2011).

La elección del material dependerá del tipo de alimento en el que se emplee, sin embargo, existen una serie de características generales que se deben cumplir en el proceso de encapsulación y que se citan a continuación (McClements y col., 2009):

- a) El material empleado debe encapsular una cantidad apreciable del ingrediente funcional, de manera que sea fácilmente incorporado en sistemas alimentarios.
- b) El material debe proteger al ingrediente funcional de la degradación química, como oxidación o hidrólisis, para que permanezca en una configuración activa.
- c) El material debe permitir la liberación del ingrediente funcional en su lugar de acción a una velocidad determinada, en respuesta a las condiciones del mismo, como son el pH, la temperatura o la fuerza iónica.
- d) El material debe ser compatible y no reaccionar con la matriz alimentaria que le rodea.
- e) El material debe permanecer inalterado a lo largo del proceso de producción, almacenamiento y transporte del alimento de uso específico para la salud.

Entre las técnicas físico-químicas y mecánicas de encapsulación de ingredientes funcionales más empleadas se encuentran la formación de nanopartículas, emulsiones, inclusiones, destacando las inclusiones en ciclodextrinas, coacervación, secado por pulverización, la formación de liposomas, la liofilización y la cocrystalización.

En la tabla 1 se muestran ejemplos de algunos de los ingredientes funcionales más empleados en la industria alimentaria y las formas más habituales de encapsulación. La encapsulación del resveratrol en distintas estructuras como nanocápsulas de polietilenglicol, incrementa su acción, al potenciar su efecto anticancerígeno y favorecer su paso a través de la membrana plasmática de células de glioma (Shao y col., 2009). Del mismo modo, la nanoencapsulación de omega 3 y su incorporación con aceite de lino en nanocápsulas formadas con almidón de maíz durante la fabricación del pan, disminuye la oxidación del ácido graso (Gökmen y col., 2011). También, la nanoencapsulación de flavonoides como EGCG ha demostrado mantener su actividad antioxidante y, además,

estas nanocápsulas se han mostrado estables a lo largo de 4 semanas, mientras que este compuesto en una solución acuosa se degrada en tan solo 4 horas (Barras y col., 2009; Shutava y col., 2009).

Tabla 1: Ejemplos de ingredientes funcionales y métodos de encapsulación

Ingrediente funcional	Método de encapsulación	Referencia
Resveratrol	Nanoencapsulación Inclusión en ciclodextrinas Liposomas	(Shao y col., 2009) (Lucas-Abellán y col., 2007) (Fang y col., 2007)
Curcumina	Nanoencapsulación Inclusión en ciclodextrinas Liposomas	(Anand y col., 2010) (Darandale y Vavia, 2013) (Takahashi y col., 2009)
Epigallocatequin galato (EGCG)	Coacervación Nanoencapsulación	(Shutava y col., 2009) (Barras y col., 2009)
Quercitina	Nanoencapsulación Inclusión Emulsión Liposomas	(Barras y col., 2009) (Mercader-Ros y col., 2010) (Di Mattia y col., 2009) (Priprem y col., 2008)
Vitamina A	Emulsión Liposomas	(Sauvant y col., 2012)
Omega 3	Nanoencapsulación Emulsión	(Gökmen y col., 2011) (Deshpande y col., 2013)
Vitamina D	Emulsión Nanoencapsulación	(Ziani y col., 2012) (Teng y col., 2013)

Otro método de encapsulación, la inclusión en ciclodextrinas, protege a los ingredientes funcionales de su degradación, por ejemplo en el caso del resveratrol, reduciendo su oxidación (Lucas-Abellán y col., 2007), e incrementando la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos, como se ha descrito para la curcumina, tras su inclusión en nanoesponjas formadas con ciclodextrinas (Darandale y Vavia, 2013). Del mismo modo, Mercader-Ros y col. (2010) observaron que la inclusión en ciclodextrinas de la quercitina mejora su actividad antioxidante, debido a la protección que le confiere frente a la oxidación por radicales libres.

La formación de liposomas y emulsiones también se han empleado para la encapsulación de vitaminas como la vitamina A, proporcionando protección frente a la oxidación (Sauvant y col., 2012).

1.2 El proceso inflamatorio y su implicación en diversas patologías

La inflamación es una respuesta biológica del sistema inmune que se desencadena bien por una infección microbiana o bien por una lesión en un tejido: isquémica, tóxica o autoinmune. En este proceso existe un conjunto complejo de interacciones entre factores solubles y células que implica un alto gasto de energía y destrucción de los tejidos afectados. La eficacia en la respuesta va a depender de lo específica y rápida que sea ésta, limitando así las lesiones que se puedan provocar. La respuesta inflamatoria tiene el propósito de eliminar el agente causante del daño para reestablecer en el mínimo tiempo posible la funcionalidad y la homeostasis de los tejidos. En una respuesta inflamatoria aguda las condiciones de homeostasis se recuperan en un periodo de tiempo corto. Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria se prolonga debido a situaciones patológicas, bien porque no finalice la respuesta aguda o porque no se elimine el agente causal, se desencadena una respuesta inflamatoria de tipo crónico. En una inflamación de tipo crónico, la respuesta inflamatoria suele provocar un daño mayor que el agente que desencadena el proceso (Nathan, 2002; Medzhitov, 2008).

En el desarrollo y progresión de la inflamación crónica, que está en el origen de diversas patologías, influyen tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, ya que participan monocitos activados y linfocitos T, que liberan una serie de citoquinas que promueven el proceso inflamatorio. Entre las principales patologías que se desencadenan por un proceso inflamatorio crónico están, dentro de las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y el binomio obesidad y diabetes, el cáncer, la artritis reumatoide o algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Akiyama y col., 2000; Nathan, 2002; Zhang, 2008).

- *Enfermedades cardiovasculares*

La principal causa de muerte en los países desarrollados son las enfermedades cardiovasculares que causan cada año más de 17 millones de muertes en todo el mundo. Dentro de las enfermedades cardiovasculares una de las que tienen mayor incidencia es la

aterosclerosis, caracterizada por dos eventos clave, la acumulación de lípidos y la inflamación (Zhong-qun y Göran, 2007). Esquemáticamente se representan en la figura 2 los eventos clave que tienen lugar en la formación de la placa de ateroma.

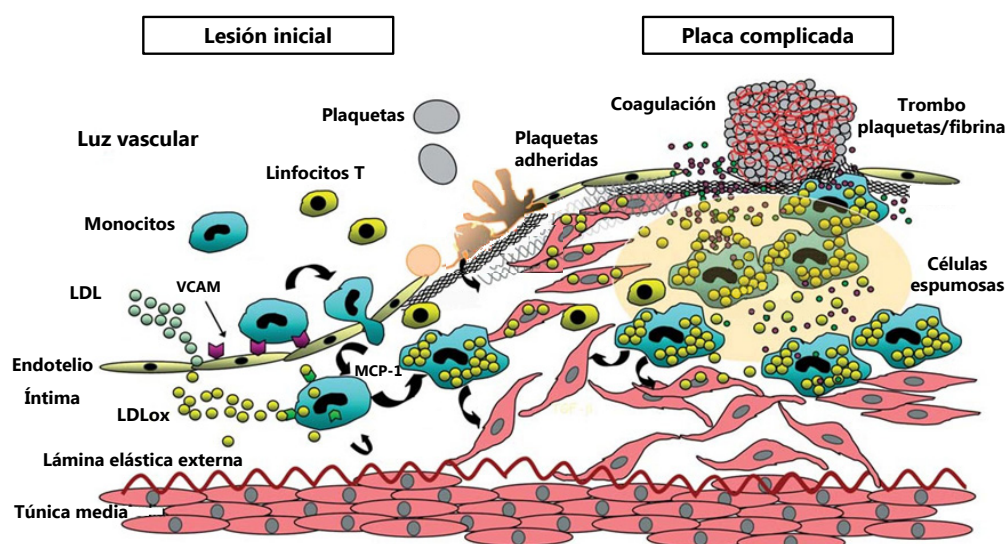


Figura 2: Proceso de formación de la placa de ateroma

El origen de esta enfermedad está en la abundancia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el torrente sanguíneo, lo que provoca una disfunción endotelial, haciendo que las LDL se infiltren a la capa íntima de las arterias y se oxiden (Skalen y col., 2002; Leitinger, 2003). La infiltración y retención de LDL oxidadas (LDLox) en la capa de la íntima desencadena una respuesta inflamatoria en la pared arterial. Inicialmente la presencia de LDLox activa el endotelio vascular haciendo que las células de su superficie expresen moléculas de adhesión de leucocitos (VCAM-1), favoreciendo que los monocitos circulantes del torrente sanguíneo, al unirse a estas moléculas de adhesión, atraviesen el endotelio y lleguen a la íntima. Una vez en la íntima los monocitos se diferencian a macrófagos y comienzan a fagocitar LDLox. La acumulación en el citoplasma de LDLox ocasiona en los macrófagos su transformación a células espumosas. Paralelamente en los macrófagos se activa una respuesta inflamatoria que se traduce en la secreción de diversos factores, como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α o la interleuquina (IL)-1 β . Estas señales que indican el inicio de un proceso inflamatorio favorecen que linfocitos T circulantes se infiltren hacia la íntima.

A su vez, la disfunción del endotelio provoca que las plaquetas del torrente sanguíneo comiencen a adherirse a su superficie y el colágeno en su cara interna. Cuando las plaquetas se activan, liberan gránulos que contienen citoquinas y factores de crecimiento que, junto con la trombina, provocan una migración y proliferación de células del músculo liso de la túnica media y monocitos. En este proceso, las plaquetas van a liberar también ácido araquidónico que se transforma en prostaglandinas como el tromboxano A₂, uno de los vasoconstrictores más potentes y que provoca la agregación de las plaquetas o bien puede transformarse en leucotrienos, que amplifican la respuesta inflamatoria.

La desestabilización de la lesión inicial que causa la placa de ateroma, provoca una inhibición de la formación de una capa fibrosa en la superficie de la misma, la rotura de la capa de colágeno y, por lo tanto, el inicio de la formación de un trombo, que puede derivar en trombosis e isquemia (Ross, 1999; Libby, 2002; Leitinger, 2003; Osterud y Bjorklid, 2003; Göran y Hansson, 2005; Lorkowski y Cullen, 2007; Zhong-qun y Göran, 2007).

- *Binomio obesidad y diabetes*

Los primeros indicios de la relación entre el proceso inflamatorio y enfermedades relacionadas con el metabolismo como la obesidad y la diabetes surgieron en el año 1993. Hotamisligil y col. (1993), demostraron que los adipocitos secretan una serie de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , que en el caso de animales obesos se incrementa de forma muy acusada. Tras neutralizar el TNF- α secretado con un receptor soluble de esta citoquina, la resistencia a insulina en estos animales se redujo. Estos datos aportaron el primer nexo de unión entre el incremento en la expresión y concentración en plasma de una citoquina proinflamatoria y la resistencia a insulina. Trabajos posteriores confirmaron que la obesidad es un estado de inflamación crónica que puede relacionarse con el incremento en la concentración plasmática de proteína C reactiva, IL-6 o el inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), que se secretan mayoritariamente por células del tejido adiposo (Lundgren y col., 1996; Mohamed-Ali y col., 1997; Yudkin y col., 1999).

Los adipocitos son las principales células responsables de la secreción de mediadores proinflamatorios, sin embargo está descrito que los macrófagos, que se encuentran también en el tejido adiposo, participan en este proceso regulando la

actividad secretora de los adipocitos (Xu y col., 2003). Los adipocitos además de secretar citoquinas proinflamatorias, también liberan moléculas importantes relacionadas con el proceso inflamatorio, como son la leptina y la adiponectina. La leptina tiene funciones inmunomoduladoras y posee actividad proinflamatoria (Nakata y col., 1999; La Cava y col., 2004) y, por el contrario, la adiponectina, secretada en una alta concentración en individuos normales, tiene una potente actividad antiinflamatoria y antiaterogénica. Sin embargo en individuos obesos, los niveles de secreción de adiponectina caen de forma muy acusada (Kubota y col., 2002; Ukkola y Santaniemi, 2002).

La resistencia a la insulina es uno de los eventos clave en el desarrollo de la diabetes tipo 2, cuyo principal factor de riesgo es la obesidad. La relación entre el desarrollo de un proceso inflamatorio y la resistencia a insulina fue demostrada inicialmente, de nuevo, por Hotamisligil y col. (1993). Estos autores demostraron que $\text{TNF-}\alpha$ induce la serin-fosforilación del sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) y la consecuente serin-fosforilación del receptor de insulina. Esta fosforilación del receptor impide que se fosforilen los aminoácidos de tirosina y por tanto interfiere en la transducción de la señal de la insulina. De IL-6 y $\text{TNF-}\alpha$ se ha descrito que inducen la expresión de SOC-3, una proteína que provoca la ubiquitinación y consecuente degradación en el proteosoma de IRS-1 (Emanuelli y col., 2001; Senn y col., 2003). Estas y otras evidencias científicas demuestran la relación directa que existe entre la inflamación y la resistencia a insulina.

- *Cáncer*

También se ha relacionado el desarrollo de un proceso inflamatorio con la aparición de ciertos tipos de tumores; así está descrito que la inflamación es un componente crítico en la progresión tumoral. Varios tipos de cáncer aparecen tras una infección, una irritación crónica o una inflamación ya que provocan un incremento en la proliferación celular, hipótesis ya planteada por Virchow en 1863 (Balkwill y Mantovani, 2001). De este modo, se conoce que la inflamación crónica está detrás del origen de aproximadamente un 20% de los casos de cáncer en humanos, entre ellos el de vejiga, cervical, gástrico, intestinal, esofágico, cáncer de ovario, próstata y tiroides (Mantovani y col., 2008). La progresión de un tumor depende en parte de la presencia de macrófagos activados, pero no sólo del número sino de su perfil de secreción de citoquinas. Estos macrófagos secretan interferones y otras citoquinas como IL-4, IL-12 o IL-13 que

favorecen el desarrollo de una respuesta inmune (Pollard, 2004). Pero el proceso inflamatorio no sólo ayuda a la progresión del cáncer, sino que también participa en su iniciación, así se ha demostrado el efecto de la inflamación crónica en el desarrollo de tumores gástricos tras la infección por *Helicobacter*, estando relacionado con el incremento en la expresión génica de NF- κ B (Pikarsky y col., 2004). En cuanto al tratamiento del cáncer, está demostrado que fármacos antiinflamatorios no esteroideos reducen el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer como el de pulmón o colon. Otra evidencia de la relación entre el cáncer y la inflamación queda demostrada por la vinculación existente entre la mutación de oncogenes como RAS o MYC y el incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias (Sparmann y Bar-Sagi, 2004; Shchors y col., 2006).

- *Artritis reumatoide*

La artritis reumatoide es otro caso más de una enfermedad que cursa por una inflamación crónica. Es una enfermedad sistémica, crónica, inflamatoria, que comúnmente se desarrolla en las articulaciones y que afecta aproximadamente a un 1% de la población mundial adulta. Varios son los factores que se han descrito como desencadenantes de esta enfermedad, genéticos, ambientales e incluso agentes infecciosos. Se ha encontrado que en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide existe una sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- α . Estas citoquinas promueven la inflamación de las articulaciones, el crecimiento de células sinoviales y pueden inducir la diferenciación de los osteoclastos, teniendo por tanto un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Además, la inflamación sistémica que tiene lugar durante la artritis reumatoide se relaciona con la aparición de aterosclerosis. De este modo, pacientes con artritis reumatoide tienen altos niveles de proteína C reactiva, un marcador de inflamación relacionado con el riesgo cardiovascular. La liberación sistémica de citoquinas proinflamatorias en pacientes con artritis reumatoide en el tejido sinovial promueve procesos aterogénicos en hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y endotelio vascular, induciendo además resistencia a insulina, activación del endotelio o dislipemia (Horai y col., 2000; Libby, 2008).

- Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad provocada por un trastorno neurodegenerativo que se desarrolla con la edad y que aparece tras una pérdida progresiva de la función cognitiva, constituyendo la principal causa de demencia en la población de avanzada edad. Se caracteriza por la acumulación progresiva del péptido β -amiloide que forma placas en el parénquima cerebral y la formación de ovillos en las neuronas, como resultado de una fosforilación anormal de los microtúbulos. El desarrollo de un proceso inflamatorio puede aparecer con el inicio de la enfermedad e incluso puede acelerar sus efectos. Se han encontrado niveles altos en el cerebro de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), que participa en la señalización de la inflamación, en estadios tempranos de la enfermedad y de IL-6, en pacientes con una evolución avanzada. La secreción de TNF- α e IL-1 β también se incrementa en la microglía de pacientes con Alzheimer (Akiyama y col., 2000; Lue y col., 2001; Wyss-Coray, 2006). Por tanto, es posible desarrollar algunos tipos de tratamientos antiinflamatorios que mejoren los síntomas de la enfermedad según la situación clínica. Por otro lado, está descrito que, antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno disminuyen la inflamación y la formación de la placa amiloide en el cerebro (Lim y col., 2000).

1.2.1 Principales mediadores implicados en el proceso inflamatorio

La respuesta inicial del sistema inmune frente a una infección o un daño tisular es una respuesta inmune de tipo innato que cursa con una inflamación aguda, en la que tiene lugar una acumulación de leucocitos y proteínas plasmáticas. Los leucocitos y las proteínas plasmáticas circulan por el torrente sanguíneo y son reclutados en el lugar en el que sucede la infección o el daño tisular. Típicamente las poblaciones de leucocitos mayoritarias que llevan a cabo la respuesta inmune innata son neutrófilos y monocitos. Los monocitos constituyen una de las poblaciones celulares con mayor importancia en el desarrollo del proceso inflamatorio. Así, la diferenciación de los monocitos a macrófagos en el lugar de la infección, es decir su activación, permite a los macrófagos emplear su actividad fagocítica para eliminar al agente causante del daño (figura 3) (Abbas y col., 2012).

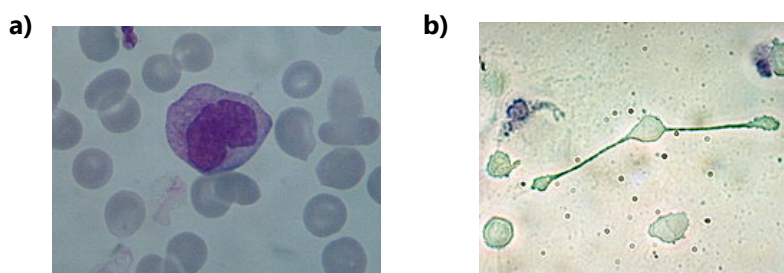


Figura 3: Fotografías al microscopio de un monocito a) y un macrófago diferenciado b)

Los macrófagos realizan principalmente la función de reconocimiento de un antígeno y de respuesta rápida frente a éste, que va a ser diferente según el tipo de señales que les lleguen. Durante el proceso de reconocimiento, los macrófagos detectan lo que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos, por medio de receptores de membrana específicos. La unión del ligando con su receptor puede ocasionar por un lado su internalización para destruirlo o bien una cascada de señalización intracelular (Taylor y col., 2005; Vega y Corbí, 2006).

Una de las respuestas iniciales del sistema inmune ante una infección o un daño tisular, es la secreción de citoquinas por parte de los macrófagos tisulares, una respuesta que tiene lugar en el inicio de un proceso inflamatorio agudo. Tres de las citoquinas proinflamatorias más importantes de la respuesta inmune innata son $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 (Abbas y col., 2012). En la figura 4 se muestran esquemáticamente las rutas de señalización de estas citoquinas además de la de IL-10 .

El nombre de la citoquina $\text{TNF-}\alpha$ procede de su primera identificación en los años 70, tras demostrarse que causa necrosis en tumores, debido a que provoca una inflamación local y trombosis de los vasos sanguíneos que riegan el tumor. Esta molécula es un mediador de la respuesta inmune aguda, que se secreta en respuesta a infecciones y daño tisular, activando la coagulación, induciendo fiebre, incrementando la adhesión de células al endotelio o activando en macrófagos la secreción de citoquinas como IL-1 e IL-6 . La citoquina $\text{TNF-}\alpha$ en su estructura madura de 17 KDa, normalmente se secreta en macrófagos y células dendríticas. Una vez liberada al espacio extracelular, se une a sus receptores específicos, glucoproteínas transmembrana TNF-RI o TNF-RII , presentes en la mayoría de los tipos celulares. En el dominio intracelular de los receptores se unen las

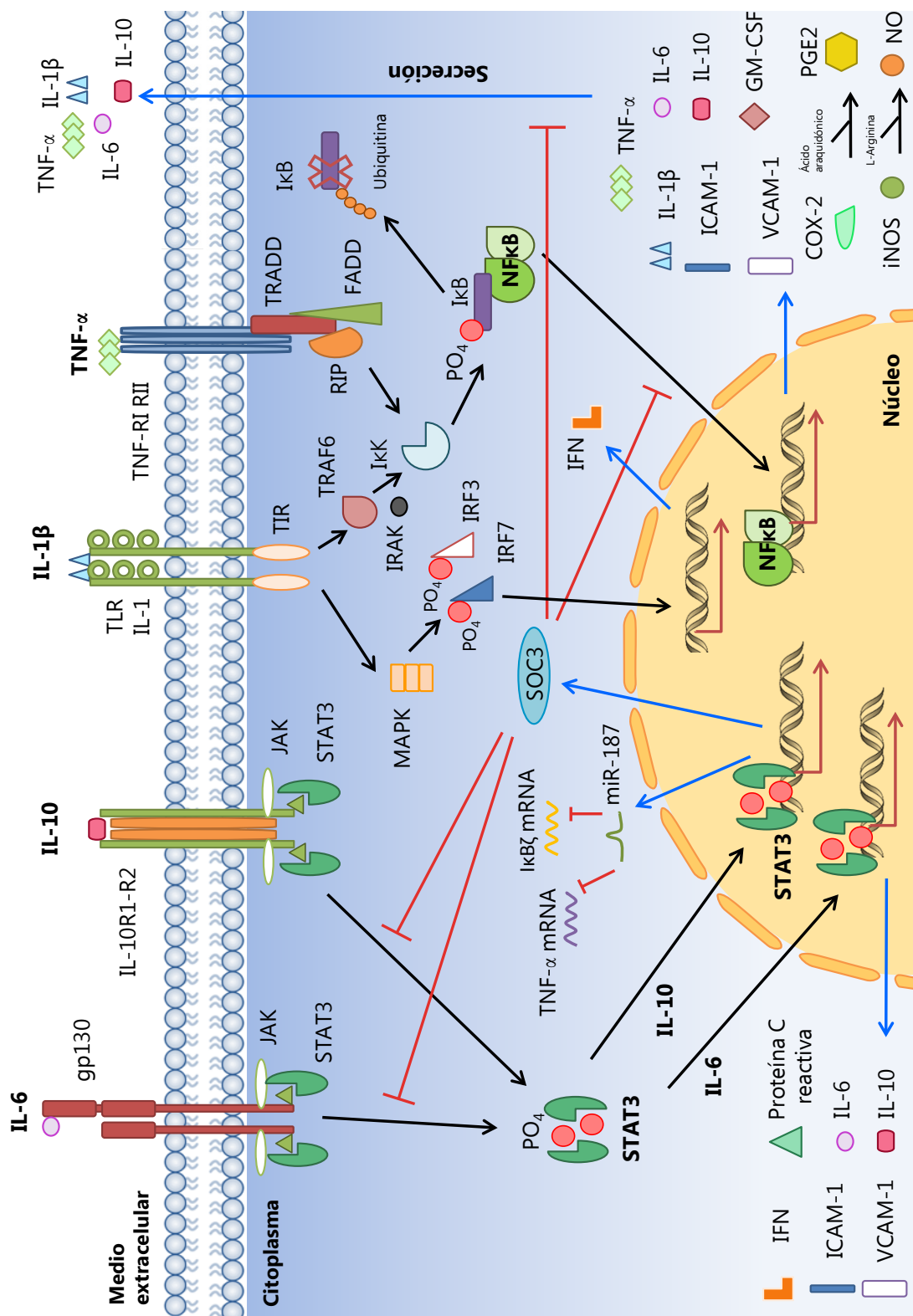


Figura 4: Principales rutas de señalización en macrófagos de los mediadores que participan en el proceso inflamatorio

moléculas TRADD, FADD y RIP, responsables del inicio de la cascada de señalización del factor de transcripción NFκB. La unión de TNF-α a sus receptores específicos desencadena una vía de señalización que provoca la activación de IκK, kinasa de IκB, cuya función es desfosforilar la proteína IκB que está unida a NFκB en el citoplasma y que en su forma fosforilada impide que el factor de transcripción lleve a cabo su función. Al desfosforilarse IκB también se unen varias moléculas de ubiquitina, favoreciendo su degradación en el proteasoma, quedando de esta forma NFκB libre en el citoplasma, que atraviesa la membrana del núcleo y activa la expresión de los genes que regula (Oeckinghaus y col., 2011; Abbas y col., 2012).

La interleuquina IL-1β es también un mediador que se libera en situaciones de inflamación aguda por los macrófagos y tiene un efecto similar al de TNF-α, induce la fiebre o activa la coagulación. Su expresión génica se induce por la presencia de otras señales, como TNF-α e IL-6. La producción de esta citoquina requiere de dos señales, por un lado, una activación de la transcripción y traducción del gen que la expresa y da lugar a una proteína precursora y, por otro, una activación del inflamasoma que rompa proteolíticamente la proteína y de lugar a la interleuquina madura de 17 KDa. Tras su secreción se une a receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática de un gran número de tipos celulares, los receptores tipo I IL-1 pertenecientes a la familia TLR, que contienen un dominio intracelular conservado Toll/IL-1 (TIR). Tras la unión de la citoquina a su receptor, tiene lugar la dimerización del receptor y la unión de la proteína kinasa IRAK. Posteriormente esta proteína IRAK con objeto de transmitir la señal, hace de adaptador entre la proteína TRAF6 y la ubiquitin ligasa E3 que activan la kinasa IκK. La activación de IκK desencadena una desfosforilación de IκB, quedando libre el factor de transcripción NFκB. Otras rutas de activación de esta familia de receptores implican la activación de la ruta de las MAP kinasas que activan la fosforilación de IRF3 e IRF7, proteínas que inducen la transcripción de los interferones (IFN) tipo I (Abbas y col., 2012).

Otra de las interleuquinas importantes en el proceso inflamatorio es IL-6, con efectos tanto locales como sistémicos. Esta citoquina se sintetiza principalmente en macrófagos, células endoteliales vasculares y fibroblastos en respuesta a citoquinas como TNF-α o IL-1. Principalmente induce la producción de proteínas como la proteína C reactiva o el fibrinógeno, aumenta el número de receptores VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie celular, un factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B (Romano y col.,

1997; O'Shea y Nutman, 2001). IL-6 es un homodímero que se une a sus receptores específicos, dos cadenas polipeptídicas que contienen una subunidad denominada gp130 que transduce la señal intracelular por la ruta JAK-STAT3. La enzima JAK inicialmente fosforila la cadena intracelular del receptor, siendo entonces reconocida por dos monómeros de STAT3. A continuación JAK facilita la activación, mediante fosforilación y dimerización de STAT3 que, a continuación, se transloca al núcleo donde activa la expresión de los genes que regula, entre ellos IL-6, IL-10 o IFN γ (Yu y col., 2007; Yu y col., 2009; Abbas y col., 2012).

Durante el desarrollo de un proceso inflamatorio, aparte de citoquinas proinflamatorias, es necesario un control y regulación de la respuesta por medio de la secreción de mediadores antiinflamatorios que limiten el daño. Entre esos mediadores se encuentra IL-10, una citoquina antiinflamatoria con un papel fundamental en la prevención de la inflamación y de patologías autoinmunes, teniendo una regulación por *feedback* negativo. En ausencia de IL-10 las células no son capaces de regular y revertir la respuesta inflamatoria. Esta citoquina se expresa en la mayoría de las células del sistema inmune, incluidos los macrófagos. Una vez en el medio extracelular, IL-10 es reconocida por receptores específicos: IL-10R, un tetrámero que consiste en dos subunidades, IL-10R1, donde se une IL-10 y dos subunidades IL-10R2, responsables de transducir la señal. La transducción de la señal es similar a la de IL-6, por medio de una ruta JAK/STAT3, mediante la fosforilación de STAT3 y la formación de un dímero que una vez en el interior del núcleo activa la expresión génica de diversos genes. Entre los genes en los que se induce la expresión se encuentra SOCS3, una proteína supresora de la señal de las citoquinas; SOCS3 inhibe la ruta de señalización de activación de la respuesta inflamatoria impidiendo la entrada de NF κ B en el núcleo, asimismo puede inhibir la ruta de señalización que activa su expresión génica, JAK/STAT3 (Saraiva y O'Garra, 2010; Abbas y col., 2012; Murray y Smale, 2012). Recientemente, otro mecanismo de acción de IL-10 que regula negativamente la expresión de TNF- α e IL-6, ha sido demostrado en macrófagos humanos que han sido estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS). En este caso la unión de IL-10 a su receptor específico activa la síntesis del microARN 187 (miR-187). Este micro ARN en su forma madura se une específicamente al ARN mensajero de TNF- α y de la proteína nuclear I κ B ζ , necesaria para la expresión génica de IL-6, impidiendo su traducción (Rossato y col., 2012).

Además de secretar citoquinas, los macrófagos activados en situación de inflamación también incrementan la síntesis de algunas enzimas con actividad proinflamatoria, como la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). COX-2 sintetiza prostaglandina E₂ (PGE₂) a partir de ácido araquidónico, en presencia de señales proinflamatorias, ya que existe otra isoforma de esta enzima, COX-1 cuya expresión es constitutiva. La actividad de COX-2 se induce normalmente en lesiones aterogénicas donde los macrófagos incrementan su expresión en presencia de TNF- α e IL-1 β . La secreción de PGE₂ en una lesión incrementa la vasodilatación y favorece la progresión de la inflamación (Huang y col., 2000; Posadas y col., 2000; Samad y col., 2001). Por todo ello, la síntesis de COX-2 es una de las dianas más importantes de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (Kurumbail y col., 1996).

Otra de las enzimas que incrementan su síntesis en los macrófagos durante la respuesta inflamatoria es la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), responsable de la producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina (Wu y Meininger, 2002). La expresión génica del gen que codifica iNOS está regulada por los factores de transcripción NF κ B y AP-1, entre otros, ya que dependiendo del estímulo se activa una ruta de señalización diferente (Ganster y col., 2001). Un incremento en la producción de NO debido a un proceso inflamatorio, promueve la aparición de enfermedades como la aterosclerosis o la artritis reumatoide (Ueki y col., 1996; Detmers y col., 2000). El NO tiene, además, en los macrófagos activados, un efecto tóxico frente a microorganismos patógenos (Nathan y Hibbs Jr, 1991).

Como se ha indicado anteriormente, varias de las rutas de señalización de citoquinas proinflamatorias terminan en la activación de NF κ B, un factor de transcripción que realiza su función en el interior del núcleo al unirse a promotores específicos de los genes que expresa. NF κ B está formado por dos subunidades capaces de unirse al ADN, NF κ B1 y NF κ B2 que forman un heterodímero con los activadores transcripcionales RelA, C-Rel, y RelB. NF κ B va a activar la expresión génica de moléculas proinflamatorias que facilitan el reclutamiento de leucocitos, incluidas moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 o GM-CSF, un factor estimulador de granulocitos y macrófagos, COX-2, citoquinas como TNF- α , IL-1 β o IL-6 o quimioquinas (Surh y col., 2001; Gonzales y Orlando, 2008; Brasier, 2010; Ben-Neriah y Karin, 2011; Oeckinghaus y col., 2011).

1.2.2 Determinación del proceso inflamatorio

Según se ha descrito, el desarrollo de una respuesta inflamatoria es un proceso complejo que implica la participación de diversos tipos celulares, su comunicación mediante la secreción de mediadores con actividad tanto proinflamatoria como antiinflamatoria y, por último, una regulación de la respuesta una vez que cesa el estímulo que la desencadena. La implicación del proceso inflamatorio en el desarrollo de diversas patologías justifica la búsqueda por parte de la comunidad científica de alternativas para prevenir su aparición. Por ello, se han desarrollado distintas técnicas que ayudan a determinar la actividad antiinflamatoria de un compuesto, tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre las técnicas más empleadas se encuentran las siguientes:

- **Ensayos *in vitro***

- a) Determinación de actividad enzimática:

- *Ensayo de inhibición de la 5-lipooxigenasa*: la enzima 5-lipooxigenasa humana se encarga de transformar los ácidos grasos, como el ácido araquidónico en leucotrienos, mediadores que participan en la respuesta inflamatoria; se trata de un ensayo *in vitro* en el que se estudia específicamente si un compuesto es capaz de inhibir la actividad de la enzima. El ensayo consiste en la incubación de la 5-lipooxigenasa con uno de sus sustratos, una solución de ácido linoleico, en presencia del compuesto a estudiar y, transcurrida la reacción, se realiza una determinación de su absorbancia a 234 nm. La enzima modifica un enlace 1-4 dieno del ácido linoleico y otros ácidos grasos insaturados, a 1-3 dieno, con lo que absorbe a 234 nm y puede determinarse colorimétricamente su concentración. Este tipo de ensayo preliminar puede ser de gran utilidad cuando se cuenta con un gran número de muestras debido a la facilidad para llevarse a cabo (Baylac y Racine, 2003; Charlier y Michaux, 2003; Kamatou y col., 2010).
- *Ensayo de inhibición de la xantina oxidasa*: la enzima xantina oxidasa se encarga de la síntesis de especies reactivas de oxígeno que contribuyen al daño oxidativo que desencadena procesos patológicos como la inflamación, la aterosclerosis o el cáncer. El ensayo consiste en la determinación colorimétrica a 295 nm del producto de la reacción de la enzima junto con el compuesto a estudiar. A continuación se

calcula el porcentaje de inhibición de la actividad que provoca (Bangou y col., 2011; Nile y Khobragade, 2011).

- *Ensayo de inhibición de la β -glucuronidasa*: al igual que en los ensayos previos, se determina la inhibición de la actividad de la enzima, tras incorporar un sustrato y el compuesto a estudiar, mediante una medida de la absorbancia, en este caso a 410 nm. Esta enzima se encuentra en situaciones no patológicas en el interior de los lisosomas de las células donde hidroliza carbohidratos. Sin embargo durante el desarrollo de un proceso inflamatorio su síntesis se incrementa y se secreta al medio extracelular (Shimoi y col., 2005; Nile y Khobragade, 2011).

b) Modelos celulares:

- *Macrófagos humanos de la línea celular de monocitos THP-1*: a partir de monocitos humanos THP-1, éstos se diferencian a macrófagos mediante la incorporación en el medio de cultivo de 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) y su posterior incubación durante 48 horas. Una vez diferenciados los macrófagos, se incorpora en el medio de cultivo de las células el compuesto a estudiar y se añade LPS para desencadenar una respuesta inflamatoria (figura 5). Los macrófagos se incuban de forma habitual durante un periodo de tiempo comprendido entre las 6 y las 24 horas con ambos compuestos, trascurridas las cuales se determina la secreción de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio mediante ensayo de inmunoenzima (ELISA). De forma habitual se determina la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β o IL-6, así como antiinflamatorias, entre ellas IL-10 (Singh y col., 2005; Wasaporn y col., 2010; Kim y col., 2011; Huang y col., 2012; Zhang y col., 2013).

Además, también se determina la síntesis de determinadas proteínas específicas, que se encuentran en el interior de los macrófagos y no se secretan, mediante la técnica de *Western blot*, como el factor de transcripción NF κ B y enzimas con actividad proinflamatoria como iNOS o COX-2 (Gómez-Hernández y col., 2006; Allen-Hall y col., 2007; Mullen y col., 2010; Kuo y col., 2011).

Normalmente también se realiza una extracción del ARN total de las células, para estudiar la expresión génica de diversos genes que codifican proteínas

clave del proceso inflamatorio, pudiéndose determinar esta expresión génica a distintos periodos de incubación, en estudios de cambio de expresión génica con el tiempo. Es común el estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real de factores de transcripción como NFκB, interleuquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, enzimas con actividad proinflamatoria como COX-2, iNOS o proteínas de adhesión (Grzanna y col., 2004; Huang y col., 2008; Kuppan y col., 2010; Zhang y col., 2010; Ahn y Je, 2012).

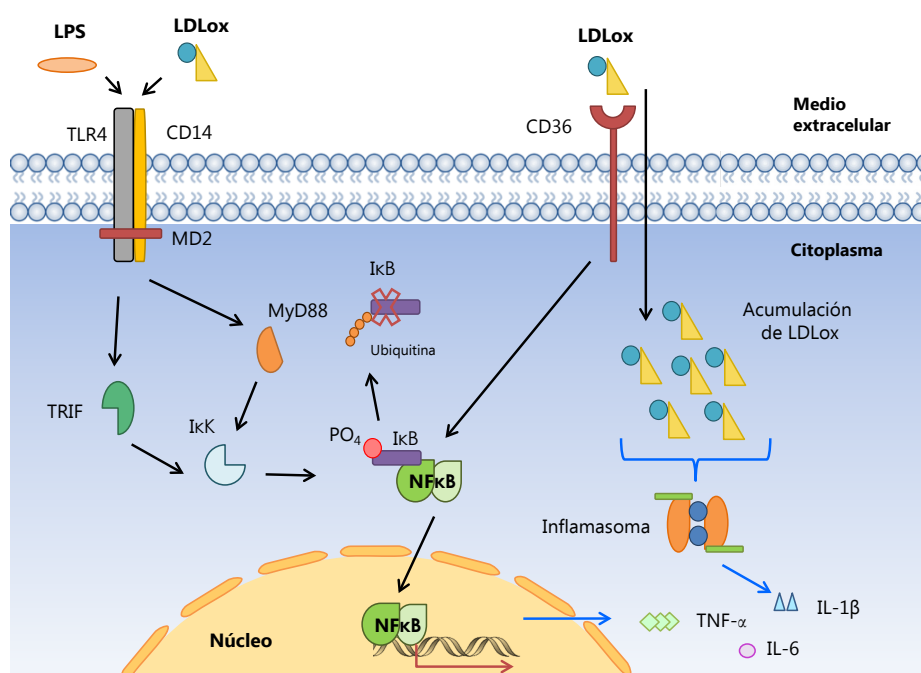


Figura 5: Cascadas de activación de macrófagos mediante la incorporación de LPS o de LDLox.

La estimulación de los macrófagos también se puede llevar a cabo mediante la adición de LDLox al medio de cultivo. En este caso, el proceso inflamatorio que se desencadena es dependiente de oxidación y uno de los eventos claves en el desarrollo de un proceso aterogénico (figura 5) (Kaperonis y col., 2006; Choi y col., 2007).

- *Macrófagos de ratón de la línea celular RAW 264.7:* La utilización de esta línea celular de macrófagos de ratón es otro modelo celular de inflamación empleado de forma habitual. El procedimiento del ensayo es similar al que se realiza con macrófagos humanos procedentes de la línea celular THP-1, pudiéndose activar las

células para simular un estado inflamatorio con LDLox o LPS. La determinación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos a estudiar se realiza con ensayos tanto de medida de la expresión como de la secreción de mediadores implicados en la respuesta inflamatoria (Otterbein y col., 2000; Kuo y col., 2011; Xie y col., 2011; Xu y col., 2012; Fu y col., 2013; Yang y col., 2013).

- *Células humanas endoteliales de la vena umbilical (HUVEC)*: las células endoteliales participan en el inicio y progresión del proceso inflamatorio mediante una modificación de la permeabilidad del endotelio vascular, tanto en el proceso aterogénico como en la respuesta frente a patógenos (Ross, 1999; Raetz y Whitfield, 2002). El modelo celular más empleado para estudios relacionados con la actividad endotelial es el correspondiente a células HUVEC. En el medio de cultivo de las células se incorpora habitualmente LPS o LDLox para simular una situación de inflamación, junto con el compuesto a estudiar. Transcurrido el tiempo de ensayo se determina tanto la secreción como la expresión génica de diversos mediadores implicados en el proceso inflamatorio como citoquinas, moléculas de adhesión o factores de transcripción (Lee y col., 2009; Lee y col., 2010; Ou y col., 2010; Angel-Morales y col., 2012). La adhesión de monocitos a las células endoteliales del endotelio vascular es uno de los eventos claves en la progresión de la inflamación, ya sea en la respuesta frente a patógenos o en el proceso aterogénico. Uno de los modelos más empleados para estudiar este proceso es el co-cultivo de células HUVEC y monocitos THP-1, durante un tiempo fijado, con el compuesto a estudiar, simulando además un estado inflamatorio con LPS o TNF- α , de aproximadamente 30 minutos, transcurridos los cuales se eliminan las células no fijadas y se hace un recuento de las fijadas (Choi y col., 2012; Kim y col., 2013; Liang y col., 2013).
- **Ensayos in vivo**
 - a) Modelos animales:
 - *Inducción de edema*: Existen diversos modelos animales de ratas y ratones que se emplean para el estudio de la actividad antiinflamatoria mediante la inducción de un edema. En estos modelos se induce un edema tópico, habitualmente en la oreja, empleando aceite de croton, xileno, ácido araquidónico o PMA, entre otras sustancias, y se determina la actividad antiinflamatoria bien por la aplicación tópica

del compuesto a estudiar, bien tras su ingestión o mediante inyección (Hosseinzadeh y col., 2003; Ismaili y col., 2004; Nile y Park, 2013).

Otro tipo de ensayos similares son aquellos en los que se induce el edema en la pata de los animales de experimentación, normalmente ratones y ratas. El procedimiento de inducción del edema consiste en la inyección de histamina o carragenano de forma subcutánea en la pata, provocando la extravasación de plasma y el desarrollo de un proceso inflamatorio local. El compuesto a estudiar se suministra en forma oral o bien por inyección intraperitoneal y tras un tiempo de ensayo se determina la actividad antiinflamatoria como reducción del volumen del edema (Juhás y col., 2008a; Mahmoudi y col., 2008; Nile y Park, 2013).

- *Inducción de colitis*: este tipo de modelo en ratones y ratas es otro de los más empleados en experimentación. Para llevar a cabo estos ensayos se induce la colitis por administración intra-rectal, previa anestesia de los animales, de TNBS, ácido trinitrobencenosulfónico, que provoca una inflamación. Tras incorporar en la dieta el compuesto a estudiar y una vez pasado el periodo el ensayo, se sacrifican los animales y se estudia su efecto en la mucosa del colon, macroscópica, histológica o bioquímicamente (Bukovská y col., 2007; Juhás y col., 2008b; d'Alessio y col., 2013; Harusato y col., 2013; Higashimura y col., 2013).
- *Inducción de un estado inflamatorio*: la inducción de un estado inflamatorio en ratones, mediante la inyección intraperitoneal de LPS, es otro de los modelos empleados habitualmente para ensayos de determinación de la actividad antiinflamatoria. El compuesto a estudiar se administra, tras inducir la inflamación, bien de forma oral o inyectado y transcurrido el tiempo de ensayo, se recogen muestras de sangre en las que se mide la concentración en plasma de citoquinas relacionadas con el proceso inflamatorio (Xue y col., 2006; Achoui y col., 2010; Hong y col., 2012).

b) Ensayos en humanos:

Los ensayos en humanos se realizan incorporando en la dieta de individuos sanos, o con patologías derivadas de un proceso inflamatorio, el compuesto que se desee estudiar. Una vez finalizado el periodo de ensayo, se

toman muestras de sangre en las que se llevan a cabo diversos estudios como, la determinación en plasma de la concentración de marcadores relacionados con el proceso inflamatorio o la extracción de células para estudios de cultivo celular *in vitro* (Kris-Etherton y col., 2004). Son numerosos los ejemplos en la bibliografía de este tipo de ensayos, así, en estudios relacionados con la prevención de la aterosclerosis, se determinan parámetros como los niveles de colesterol en sangre, la peroxidación lipídica en plasma, la distribución del tejido graso, la determinación de la resistencia a insulina o las medidas antropométricas (Aviram y col., 2000; Wilkinson y col., 2005; Kabir y col., 2007). En los últimos años, se están aplicando las nuevas tecnologías “ómicas”, transcriptómica, proteómica o metabolómica, para la identificación de nuevos marcadores del proceso inflamatorio que ayuden a establecer modelos predictivos del estado inflamatorio en humanos (Calder y col., 2013). En este sentido, en pacientes con artritis se han podido relacionar determinados metabolitos como lactato, taurina, LDL o acetilglicina con un incremento en los niveles de proteína C reactiva en plasma (Young y col., 2013).

1.3 Fuentes naturales de ingredientes antiinflamatorios

En la actualidad existen diversos medicamentos con propiedades antiinflamatorias que se prescriben para el tratamiento de los efectos patológicos que desencadena la inflamación crónica, cuya incidencia está aumentando de forma alarmante en los últimos años. Muchos de esos medicamentos tienen efectos tóxicos en el organismo y numerosos efectos secundarios. Por ello, existe un gran interés en la comunidad científica por buscar nuevos productos con propiedades antiinflamatorias, minimizando sus efectos perjudiciales. Una de esas alternativas es el empleo de productos de origen natural que poseen, además, una importante aceptación entre los consumidores.

Entre los productos naturales con actividad antiinflamatoria descrita destacan diversas especies de plantas, con identificación de la misma en frutos, hojas o semillas. Sin embargo, aunque la fuente principal de ingredientes funcionales con propiedades antiinflamatorias son las especies vegetales, también se ha encontrado esta actividad en otras fuentes, como especies de algas y microalgas y ácidos grasos de origen animal (Ringbom y col., 2001; Paul y col., 2006; Gautam y Jachak, 2009; Lee y col., 2013).

1.3.1 Plantas labiadas

La familia de las plantas labiadas (*Labiatae*) está formada por plantas arbustivas que pueden ser perennes o anuales y que frecuentemente son aromáticas. Se trata de una familia de hábitat cosmopolita formada por unas 5600 especies, siendo el género *Salvia* el que cuenta con un mayor número de especies (Castroviejo, 2012).

Tradicionalmente una parte importante de las especies pertenecientes a la familia de las labiadas o formulaciones a partir de ellas, se han empleado en distintas culturas para el tratamiento de diversas patologías. Los datos encontrados indican que ya en la antigua cultura egipcia se utilizaban estas plantas por sus propiedades medicinales. Entre las propiedades beneficiosas que se han descrito se encuentran actividades antimicrobianas, analgésicas, sedantes, anestésicas o antiinflamatorias. Estas propiedades se asocian fundamentalmente a la composición del aceite esencial que contienen, formado por compuestos volátiles, caracterizados por su fuerte olor y sintetizados como metabolitos secundarios. Las plantas sintetizan estos compuestos para protegerse de ataques externos debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, insecticidas e incluso para protegerse de animales herbívoros ya que reducen su apetito, además de ayudar a la dispersión del polen y las semillas, al atraer a diversos insectos (Bakkali y col., 2008; Kaefer y Milner, 2008).

El uso culinario de algunas de las especies de plantas pertenecientes a la familia de las labiadas es otra de las propiedades que las caracteriza. Se emplean habitualmente como aromatizantes y su uso está cada vez más extendido e incorporado en la gastronomía de numerosas culturas. Algunas de las especies representativas de esta familia de plantas, que destacan tanto por su uso culinario como por sus propiedades beneficiosas para la salud, son las que se describen a continuación:

- **Orégano:**

El orégano (*Origanum vulgare* L.) (figura 6) es una planta de aspecto herbáceo, perenne, con una altura de entre 30 cm y 1 m, y cepa leñosa. Tiene hojas enteras y pelosas, con una longitud de entre 2 a 4 cm y una anchura de aproximadamente 1,5 cm. Suele crecer en bordes de prados, matorrales, orlas de bosques o lindes de cultivos y principalmente en suelos básicos. Se desarrolla en toda Europa, gran parte de Asia,

noroeste de África y concretamente en toda la Península Ibérica. Principalmente se emplea para uso culinario, cosmético y medicinal (Castroviejo, 2012).



Figura 6: Detalles de la planta de orégano en flor y seca

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano donde se identifican los compuestos presentes tanto en extractos diversos como en su aceite esencial. Se han identificado flavonoides como la apigenina, la luteolina o la naringenina, agliconas, alcoholes alifáticos o derivados del fenilpropano (Justesen y Knuthsen, 2001; Hossain y col., 2011). Entre los ácidos fenólicos se ha descrito la presencia de ácido o-cumárico, ferúlico, cafeico, p-hidroxibenzoico, vainillínico, carnósico, gálico y rosmarínico (Gerothanassis y col., 1998; Hossain y col., 2011). Su aceite esencial está compuesto principalmente de timol y su isómero el carvacrol, dos monoterpenos, cuyo contenido depende de la parte de la planta de la que se extraiga y principalmente del momento de su recolección, existiendo una importante variación estacional (Kokkini y col., 1997). Otro de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial es el terpeno hidrato de sabineno, un compuesto que puede aparecer en el aceite esencial en mayor proporción que el timol y el carvacrol, aunque depende del tipo de procedimiento de extracción que se lleve a cabo (Milos y col., 2000; Fornari y col., 2012b).

Son numerosas las propiedades que se han descrito del orégano, destacando su importante actividad antioxidante y antimicrobiana (Sahin y col., 2004; Chun y col., 2005; Rodríguez-Meizoso y col., 2006). En este sentido, se ha descrito que la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de orégano, se relaciona con su alto contenido en compuestos fenólicos (Milos y col., 2000; Chun y col., 2005). El orégano puede inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* y diversas especies de los géneros *Bacillus*, *Salmonella*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Staphylococcus aureus*, lo que hace interesante su uso en la conservación de diversos alimentos (Sahin y col., 2004; Chun

y col., 2005). Además, se han encontrado perspectivas interesantes en cuanto a su uso para la prevención de las enfermedades neurodegenerativas, al inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Loizzo y col., 2009). Asimismo, se ha demostrado la actividad antiproliferativa de extractos obtenidos con etanol y un efecto antimutagénico de extractos obtenidos con metanol y fraccionados con butanol (Al-Kalalkeh y col., 2010; Gulluce y col., 2012).

Otra de las propiedades que se han descrito del orégano es su actividad antiinflamatoria, concretamente se ha empleado el aceite esencial suplementado en la dieta, junto con el de tomillo, en el tratamiento de colitis en ratón, provocando una disminución de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, en las células del colon (Bukovská y col., 2007). En ensayos previos llevados a cabo por el Grupo de Investigación, se ha encontrado que extractos supercríticos de orégano disminuyen la secreción y expresión génica de TNF- α , IL-1 β e IL-6, empleando un modelo de inflamación dependiente de oxidación con macrófagos humanos (Ocaña-Fuentes y col., 2010). Además de *Oreganum vulgare*, otras especies como *O. ehrenbergii* y *O. syriacum* poseen actividad antiinflamatoria, comprobándose que extractos obtenidos por hidrodestilación disminuyen la producción de NO en células de ratón en más de un 50%, con concentraciones superiores a 66 mg/mL (Loizzo y col., 2009).

- *Salvia*:

La salvia (*Salvia officinalis* L.) (figura 7) es un subarbusto de hasta 60 cm de alto con tallos ramificados. Las hojas son simples, de forma ovalada o elíptica, con un tamaño de hasta 7 cm de longitud y hasta 3 cm de ancho, con pelos de 0,2 a 1,5 mm. El color de las hojas en el haz es verde y blanquecino en el envés. Es una especie originaria de la península de los Balcanes que actualmente se encuentra dispersa por todo el mundo y concretamente por toda la Península Ibérica y Baleares. Se emplea habitualmente como condimento y desde tiempo inmemorial como planta medicinal para aliviar problemas de índole diversa (Castroviejo, 2012).



Figura 7: Detalles de la planta de salvia seca y fresca

Mediante la obtención y caracterización de extractos de salvia, empleando distintas técnicas, se ha determinado su composición química. Se ha descrito la presencia de taninos, entre un 3-7%, de tipo catéquico, β -D-glucósidos, ácido rosmarínico, flavonoides, entre ellos luteolina, apigenina y sus heterósidos, β -sitosterol, carnosol, ácido ursólico o oleanólico (Cañigual y col., 1998). En cuanto a su aceite esencial, que representa entre un 1 y 2,5% de la planta, está compuesto principalmente de monoterpenos como el 1,8-cineol y el alcanfor, aunque dependiendo de la técnica de extracción estos compuestos aparecen en mayor o menor cantidad (Glisic y col., 2010). Así, mediante una extracción por hidrodestilación el compuesto obtenido más abundante es la α -tujona, relacionada químicamente con el alcanfor (Arraiza y col., 2012).

Entre las propiedades beneficiosas descritas para esta especie y motivo por el que se utiliza de forma habitual en la medicina tradicional, hay que destacar que distintos extractos y su aceite esencial son potentes antioxidantes, antitumorales, antivirales, antimicrobianos y antiinflamatorios (Shi y Kim, 2002; Kaefer y Milner, 2008; Kamatou y col., 2010; Tajkarimi y col., 2010; Chan y col., 2011). En cuanto a la actividad antiinflamatoria, extractos de salvia obtenidos con dimetil sulfóxido (DMSO) inhiben la secreción de TNF- α e IL-6 en un 50%, cuando se tratan macrófagos de ratón con al menos 0,2 mg/mL del extracto (Mueller y col., 2010). Asimismo, se ha descrito que extractos acuosos de *Salvia miltiorrhiza* reducen la secreción de TNF- α en macrófagos de ratón, tras incorporar en las células 100 μ g/mL del extracto (Wan y col., 2006; Mueller y col., 2010). Además, diversas especies del género *Salvia* han demostrado poseer la capacidad de inhibir la actividad de la enzima 5-lipooxigenasa, correlacionándose este hecho con su actividad antiinflamatoria (Kamatou y col., 2008; Kamatou y col., 2010). Sin embargo, los valores IC₅₀, concentración de extracto necesaria para inhibir un 50% la actividad de la enzima 5-lipooxigenasa, son

muy variables dependiendo de la especie empleada (Baylac y Racine, 2003; Kamatou y col., 2008).

- **Tomillo:**

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (figura 8) es una planta sufruticosa, perenne de 10 a 40 cm de altura. Los tallos son rojizos, con pelos cortos y las hojas alargadas de unos 2 cm de longitud y 0,3 cm de anchura. Crece normalmente en lugares arbolados con sustratos básicos o areniscas rojas. Geográficamente se distribuye habitualmente en la región mediterránea occidental europea, concretamente en España es más abundante en la mitad este y poco característica en el sur del país. Habitualmente se emplea en gastronomía por sus características aromáticas (Castroviejo, 2012).



Figura 8: Detalle de la planta de tomillo en flor

La composición química del tomillo es particularmente dependiente de su quimiotipo, su procedencia y el momento de su recolección. Entre sus componentes principales la bibliografía resalta la presencia de flavonoides como la apigenina y la luteolina, flavonas metoxiladas como cirsilineol, cirsimaritina, timonina o eupatorina, flavanonas, flavanoides y heterósidos. Asimismo, se ha descrito la presencia de ácidos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido rosmarínico (Cañigual y col., 1998) y su aceite esencial (entre un 1 y 2% de las hojas de tomillo) contiene en su mayoría compuestos terpénicos, fenoles y alcoholes, siendo timol y carvacrol sus constituyentes mayoritarios, con concentraciones que pueden alcanzar hasta un 70% de los compuestos detectados (Jordán y col., 2006; Pirbalouti y col., 2013).

Son numerosas las propiedades saludables descritas para el tomillo. Tradicionalmente se ha utilizado para tratar diversas enfermedades respiratorias como el asma y la bronquitis (Alonso, 1998). Además, se han observado propiedades antitusivas, antisépticas, antimicrobianas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias (Soliman y Badeaa, 2002; Bukovská y col., 2007). Existen diversos estudios en los que se demuestra la actividad antiinflamatoria del aceite esencial obtenido a partir de *Thymus vulgaris*. Vigo y col. (2004) pusieron de manifiesto que 8,5 µg/mL de un extracto obtenido con una mezcla de etanol y agua disminuye significativamente la liberación de NO en macrófagos de ratón. Una reducción en la liberación de NO también ha sido descrita en otras especies de mismo género, *Thymus herba-barona* (Zuzarte y col., 2013). También se ha encontrado que extractos obtenidos con metanol de las especies de tomillo *Thymus kotschyanus* y *Thymus pubescens*, reducen el edema inducido con carragenano en las patas de rata a partir de una concentración de 50 mg/kg tras inyección intraperitoneal (Mahmoudi y col., 2008; Bakhtiarian y col., 2011). El edema de oreja inducido con aceite de croton también se reduce tras la aplicación tópica de extractos de tomillo de *Thymus satureioides*, obtenidos con cloroformo y hexano a dosis de 300 µg/cm² (Ismaili y col., 2004).

- **Albahaca:**

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) (figura 9) es una planta anual, herbácea, con tallos erectos y ramificados que puede alcanzar de 30 a 50 cm de altura. Las hojas tienen un tamaño de 2 a 5 cm, ligeramente dentadas. Las flores son de color blanco, dispuestas en espigas alargadas en la parte superior del tallo o en los extremos de las ramas. Es una planta originaria de India que se introdujo en Europa en el siglo XVI. Se cultiva en casi toda la Península Ibérica, fundamentalmente en Andalucía y Levante. Su empleo como aromatizante en el campo culinario está muy extendido (Castroviejo, 2012).

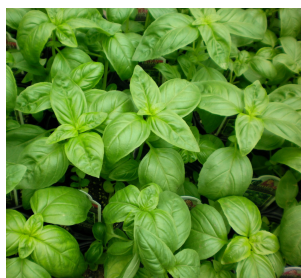


Figura 9: Detalles de la planta de albahaca

En cuanto a la composición química, está descrita la presencia de taninos, flavonoides, entre ellos xantomicrol, y heterósidos de quercetina y de kempferol, ácido cafeico, esculósido y rosmarínico (Cañigual y col., 1998; Bais y col., 2002). En las hojas de albahaca el aceite esencial se encuentra en concentraciones que oscilan entre el 0,04 y 0,70%, conteniendo entre sus compuestos mayoritarios eugenol, un fenilpropanoide y linalool, un monoterpeno que según el quimiotipo puede llegar a constituir hasta un 75% del aceite esencial, compuestos además de interés en la industria alimentaria y cosmética (Charles y Simon, 1990; Miguel, 2010). Otros monoterpenos caracterizados en el aceite esencial son el ocimeno y el 1,8-cineol (Cañigual y col., 1998).

Extractos obtenidos a partir de albahaca han demostrado tener, entre otras, actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticarcinogénica además de antiinflamatoria (Camporese y col., 2003; Chiang y col., 2005; Oxenham y col., 2005; Selvakkumar y col., 2007; Beric y col., 2008). La incorporación de 30 µg/mL de un extracto de albahaca, obtenido con metanol, en el medio de cultivo de células mononucleares asiladas de humano, puede disminuir la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β (Selvakkumar y col., 2007). En modelos animales de inflamación, como la inducción del edema de oreja en ratón con PMA, la aplicación tópica de un extracto obtenido con agua y etanol de albahaca, a una dosis de 4 mg al día durante cinco días, reduce significativamente el peso de la oreja y la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Yadav y col., 2009). En ratas en las que se induce un edema en la pata, tras la aplicación de albahaca, se encuentra una disminución significativa en la cantidad de macrófagos y neutrófilos y, por tanto, un efecto antiinflamatorio (Benedec y col., 2007). Del mismo modo, en diversos modelos de ratas con edema de pata y tratados con extracto de albahaca, obtenido con éter de petróleo, tiene lugar una inhibición de las rutas de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (Singh, 1999).

- *Mejorana:*

La mejorana (*Origanum majorana* L.) (figura 10) es una planta sufruticosa de hasta 55 cm de altura y con aspecto herbáceo. Las hojas, que poseen forma elíptica, pueden llegar a medir 2,5 cm de longitud y 1,5 cm de ancho. Crece en sustratos calcáreos, y aunque se cultiva desde antiguo, aparece asilvestrada en muchos rincones de la región mediterránea, incluido el centro y sur de España. De igual forma que los ejemplos anteriormente descritos, destaca por su uso culinario (Castroviejo, 2012).



Figura 10: *Detalle de la planta de mejorana*

Entre los compuestos mayoritarios que se encuentran en la mejorana, se ha observado la presencia de ácidos fenólicos, como el ácido rosmarínico, el cafeico, el carnósico y el gálico, así como otros compuestos fenólicos, como la luteolina, la apigenina, el carnosol o las melanoidinas (Hossain y col., 2011). Asimismo, en la mejorana están presentes el terpineol y el hidrato de sabineno, responsables de su sabor y aroma característicos, y constituyentes mayoritarios de su aceite esencial. (Komaitis y col., 1992; Vera y Chane-Ming, 1999; Vági y col., 2005b).

En cuanto a sus actividades biológicas, al igual que otras de las especies de la familia de plantas labiadas, la mejorana posee actividad antioxidante y antimicrobiana (Ezzeddine y col., 2001; Vági y col., 2005a). Se ha demostrado la importante actividad antioxidante de diversos extractos obtenidos a partir de mejorana, alcanzándose los mejores datos con el empleo de disolventes polares (Vági y col., 2005a). La actividad antimicrobiana de la mejorana es de particular interés en la industria alimentaria ya que actúa frente a bacterias presentes en los alimentos y hongos que producen micotoxinas (Vági y col., 2005b). Además, se han descrito propiedades antiinflamatorias, dada su capacidad para reducir la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-6 y la expresión génica de iNOS, en un modelo celular de inflamación empleando macrófagos de ratón activados con LPS (Mueller y col., 2010). La administración de dosis comprendidas entre 250 y 500 mg/kg de un extracto obtenido con etanol de mejorana a un modelo de ratas con úlcera, reduce su incidencia y disminuye la secreción gástrica, demostrando así su capacidad para paliar los efectos de la patología (Al-Howiriny y col., 2009).

- **Romero:**

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (figura 11) es un arbusto de hasta 1,8 m de altura. Tiene unas hojas lineares de hasta 4,5 cm de longitud y 0,3 cm de ancho. Crece en matorrales y formaciones arbóreas abiertas, preferiblemente con terrenos calcáreos. Se encuentra en casi toda la Península Ibérica, exceptuando las provincias más frías y húmedas. Además de su uso ornamental, esta especie es conocida en el ámbito culinario y en la medicina tradicional (Castroviejo, 2012).



Figura 11: Detalle de la planta de romero

El romero contiene gran cantidad de compuestos fenólicos, destacando por su abundancia el ácido carnósico y el ácido rosmarínico y derivados de los mismos como el carnosol y el rosmanol. Otros compuestos hallados son ácidos triterpénicos, entre ellos el ursólico y el betulínico y alcoholes triterpénicos como la amirina y la betulina. También se han encontrado flavonoides como luteolina, apigenina o diosmetina. El responsable principal de su aroma es el aceite esencial, que representa aproximadamente un 2,5% de la composición de la hoja. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial son terpenos, como el α -pineno, que puede llegar a constituir un 30% del aceite esencial, y el limoneno y terpenoides como 1,8-cineol, hasta un 50%, alcanfor, entre un 15 y un 25%, linalool, o borneol. Sin embargo su composición puede variar dependiendo del desarrollo de la planta en el momento de la recolección y su procedencia (Schwarz y Ternes, 1992; Schwarz y col., 1992; Hossain y col., 2011; Vicente y col., 2012a; Vicente y col., 2013).

Son numerosas las propiedades beneficiosas asociadas al romero. Destaca su capacidad antioxidante, demostrada ya en los años 50, por la que se utiliza ampliamente para la conservación de alimentos, en la industria farmacéutica y cosmética (Rac y Ostric-Matijasevic, 1955; Robards y Antolovich, 1997). Un punto de atención actual de la

comunidad científica se centra en las propiedades antitumorales del romero, en la reducción de la viabilidad de células tumorales y su aplicación como complemento que incrementa la actividad de los tratamientos antitumorales clásicos (Vicente y col., 2012b; Gonzalez-Vallinas y col., 2013). En cuanto a la actividad antiinflamatoria, existen diversos estudios en los que se intenta dilucidar su mecanismo de acción (Kuo y col., 2011; Tu y col., 2013); estudios *in vitro* empleando un modelo de inflamación con macrófagos de ratón activados con LPS, han puesto de manifiesto que un extracto de romero obtenido con etanol y fracciones del mismo con hexano y metanol inhiben la rutas de activación del proceso inflamatorio que provoca el LPS, bloqueando la activación de NFκB (Yu y col., 2013). En este sentido, extractos de romero obtenidos con etanol reducen la producción de NO, en un modelo similar de inflamación en macrófagos de ratón, existiendo un efecto dependiente de la dosis, desde los 12,5 µg/mL (Mengoni y col., 2011). Las propiedades antiinflamatorias del romero también se han encontrado en modelos animales. En ratones a los que se les ha inducido pleuritis con carragenano, la administración de un extracto crudo de romero o diversas fracciones de hexano, acetato de etilo y etanol, inhiben la migración de leucocitos y su exudación, además de disminuir la secreción de TNF-α e IL-1β, efecto que se ha asociado al carnosol, ácido betulínico y ácido ursólico presentes en los extractos (Benincá y col., 2011). En modelos de inflamación de colitis en ratas inducida con TNBS, la inyección intraperitoneal o la administración oral de 100 a 400 mg/kg de un extracto hidroalcohólico de romero o su aceite esencial, tiene efectos antiinflamatorios (Minaiyan y col., 2011).

1.4 Extracción de ingredientes alimentarios funcionales mediante tecnologías limpias

Tradicionalmente para la obtención de ingredientes funcionales a partir de plantas se han empleado técnicas de extracción con disolventes orgánicos, siendo la más empleada la extracción sólido-líquido. Esta técnica junto a la extracción líquido-líquido, en las que se emplean disolventes orgánicos, son laboriosas, requieren mucho tiempo de extracción, tienen baja reproducibilidad, son poco selectivas, se obtienen bajos rendimientos de extracción y requieren de grandes volúmenes de disolventes que normalmente son tóxicos (Wang y Weller, 2006). En este contexto están surgiendo nuevas técnicas de extracción que mejoran estos aspectos aportando una extracción más rápida, una mayor reproducibilidad y selectividad, con el empleo de disolventes no tóxicos más

respetuosos con el medio ambiente, en el entorno de la denominada *"Green Analytical Chemistry"*, caracterizada por unos nuevos métodos de extracción y procesamiento de muestras, con el propósito de reducir la cantidad de disolventes tóxicos y ácidos, simultanear la extracción de varios compuestos e incrementar la automatización y el rendimiento. En este sentido, encontramos las siguientes técnicas: la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción asistida por microondas, la extracción con fluidos supercríticos y la extracción con líquidos presurizados (Herrero y col., 2006; Mendiola y col., 2007; de la Guardia y Armenta, 2011).

1.4.1 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) se basa en la utilización de un disolvente en estado supercrítico, estado que se alcanza a una temperatura y presión superiores al punto crítico como puede apreciarse en la figura 12. En este diagrama aparecen tres regiones diferenciales que corresponden a tres de los estados de agregación de la materia: sólido, líquido y gaseoso. Estas regiones aparecen separadas por líneas que representan el equilibrio entre fases, así, existen las denominadas curvas de sublimación, fusión y vaporización. Al modificar la temperatura y presión mediante el aporte de energía, se consigue el cambio entre fases. Asimismo, aparece señalado en la figura el denominado punto triple, el único punto en el que coexisten los tres estados, sólido, líquido y gas. Al finalizar la curva de vaporización, se encuentra otro punto destacado del diagrama, el punto crítico, un punto a partir del cual por más que se incremente la presión y la temperatura, el fluido va a permanecer en condiciones supercríticas. Este punto fue definido por primera vez por el barón Charles Cagniard de la Tour en 1822, al observar que calentando un gas por encima de su temperatura crítica, por más que se incremente la presión no alcanza el estado líquido (Luque de Castro y col., 1993).

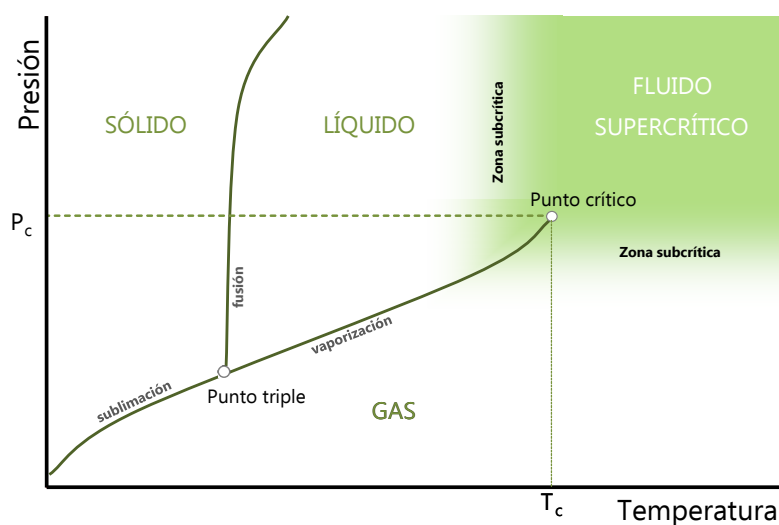


Figura 12: Diagrama de fases sólido/líquido/gas. P_c , presión punto crítico, T_c , temperatura punto crítico

Un fluido al alcanzar las condiciones supercríticas posee unas características intermedias entre el estado líquido y el gaseoso. Como puede observarse en la tabla 2, las propiedades de densidad, viscosidad y difusividad se sitúan a caballo entre las de los líquidos y los gases. La difusividad de un fluido supercrítico alcanza entre dos y tres órdenes de magnitud superior a la de un líquido, mientras que la viscosidad es muy parecida a la de un gas, por lo que poseen una mayor velocidad de transferencia de masa de los solutos de la matriz al fluido. Por tanto los fluidos supercríticos presentan tanto el poder de solvatación de los líquidos como las propiedades de transporte de los gases.

Tabla 2: Propiedades físicas de un gas, un líquido y un fluido supercrítico

	Densidad (g/mL)	Viscosidad (g/cm×s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	$(0,1 - 2) \times 10^{-3}$	$(0,5 - 3,5) \times 10^{-4}$	0,01 - 1
Fluido supercrítico	0,2 - 1,0	$(0,2 - 1,0) \times 10^{-3}$	$(3,3 - 0,1) \times 10^{-4}$
Líquido	0,6 - 1,6	$(0,5 - 3,0) \times 10^{-2}$	$(0,2 - 2,0) \times 10^{-5}$

Uno de los puntos clave en este procedimiento de extracción es la elección de un disolvente adecuado para asegurar el éxito del proceso. Los criterios para la elección de un buen disolvente son similares a los que se exigen para otros procedimientos de extracción convencionales. De este modo, se busca que el disolvente tenga una buena selectividad, solubilidad del soluto, baja viscosidad, no reactividad, no inflamable, no tóxico y preferiblemente económico para no encarecer más el proceso de extracción. Uno de los disolventes que cumple mejor estas características es el CO_2 ; el CO_2 es asequible, relativamente inerte, posee coeficientes de difusión altos, viscosidad baja y, sobre todo, posee una temperatura y presión críticas (31,3 °C, 72,9 atm) fácilmente alcanzables con la tecnología disponible, además de ser considerado como GRAS por la FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos). A parte de estas características, la modificación de la presión y la temperatura dentro de la región crítica, cambia la densidad del CO_2 y, por tanto, el tipo de compuestos que puede extraer a partir de una misma matriz, mejorando su selectividad. Además, en los casos en los que se lleva a cabo la extracción únicamente con CO_2 , se obtienen extractos sin restos del disolvente, ya que se elimina al finalizar la extracción por despresurización.

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes del empleo de CO_2 en condiciones supercríticas es su baja polaridad y por tanto, la dificultad que tiene la extracción de compuestos polares empleando esta técnica. En los casos en que se busque la extracción de compuestos polares, se hace necesaria la incorporación de otros disolventes, denominados co-solventes, además del CO_2 en pequeñas cantidades, no superiores a un 10-20 % v/v (Schoenmakers y Uunk, 1987). Aunque existen diversos compuestos que pueden emplearse como co-solventes, en la mayor parte de los casos suele utilizarse agua y etanol.

Un equipo de extracción por fluidos supercríticos de matrices sólidas debe contener mínimamente el equipamiento que se muestra en la figura 13. Durante su funcionamiento, inicialmente el CO_2 en estado líquido es enviado por una bomba desde una botella hacia la celda de extracción. En la celda de extracción, el CO_2 se encuentra con la matriz empleada para la extracción a una presión superior a la crítica, que es controlada por una válvula. Además, la celda de extracción cuenta con control de temperatura, pudiendo elevarse por encima de la temperatura crítica, lo que favorece el contacto del CO_2 con la matriz a extraer en condiciones supercríticas. Los compuestos de la matriz que sean disueltos o arrastrados por el CO_2 precipitan en un separador una vez que se reduce

la presión y disminuye su poder solvente. En el caso del empleo de co-solventes, se adicionan mediante una bomba conectada a la corriente del CO₂.

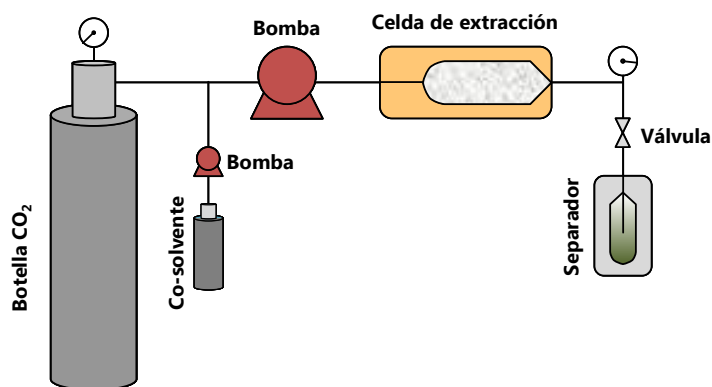


Figura 13: Esquema básico de un extractor de fluidos supercríticos

La tecnología de extracción por fluidos supercríticos se está empleando a escala industrial en el sector alimentario, cosmético, farmacéutico y químico (Beery, 2003; Pasquali y Bettini, 2008). Son muy numerosas las fuentes a partir de las cuales se están obteniendo extractos, sobre todo a escala de laboratorio, como una nueva vía para la obtención de productos e ingredientes funcionales a partir de fuentes naturales. Así, se han obtenido extractos a partir de algas y microalgas (Herrero y col., 2006), extractos vegetales a partir de plantas aromáticas como el romero (Fornari y col., 2012a), extractos para colorantes alimentarios (Cadoni y col., 1999), aceites esenciales (Reverchon, 1997), lípidos vegetales o antioxidantes (William y col., 1996; Cadoni y col., 1999). También se ha empleado en el fraccionamiento de bebidas para desalcoholización (Señorans y col., 2001), mejora de propiedades de alimentos como desgrasado o extracción del colesterol (Chao y col., 1991; Froning y col., 1998) y eliminación de la cafeína del té y el café (Kazlas y col., 1994; İçen y Gürü, 2009). De igual manera se emplea en la recuperación de la nicotina del tabaco (Sharma y col., 1991), microencapsulación (Ribeiro dos Santos y col., 2002), fraccionamiento de productos pesados del petróleo (Campbell y Lee, 1986), eliminación de pesticidas en plantas y alimentos (Lehotay, 1997; Ling y col., 1999) o teñido de tejidos (van der Kraan y col., 2007).

1.4.2 Extracción con líquidos presurizados

La técnica de extracción por líquidos presurizados (PLE) permite la obtención de extractos a partir de matrices sólidas. En este tipo de extracción se emplean disolventes a altas presiones y temperaturas, aunque se mantiene en todo el proceso de extracción el disolvente en estado líquido. Normalmente, se obtienen mejores rendimientos de extracción con temperaturas más altas, sin embargo, en cada caso hay que optimizar este parámetro ya que en muchas ocasiones una temperatura muy alta tiene efectos negativos sobre compuestos termolábiles presentes en la matriz de partida.

Otros de los parámetros importantes en el proceso son el tiempo de extracción y la presión del disolvente. Sin embargo, estos dos parámetros tienen un menor efecto crítico (Herrero y col., 2013). Algunos estudios han demostrado que la modificación de la presión del disolvente no afecta al rendimiento, siempre y cuando se mantenga en estado líquido (Herrero y col., 2005; Mustafa y Turner, 2011). El tiempo de extracción viene determinado por el tipo de procedimiento de extracción que se emplee, ya sea dinámico o estático. En un procedimiento estático, un volumen determinado de disolvente se pone en contacto con la muestra un tiempo fijado y se obtiene el extracto (Herrero y col., 2013). En muchas ocasiones no es suficiente un único ciclo de extracción para obtener un rendimiento adecuado, e incluso si se incrementa el tiempo de extracción en un único ciclo, no se consigue un rendimiento tan alto como el que se obtiene con cuatro ciclos de extracción consecutivos (Luthria, 2008). En el caso de un procedimiento dinámico, continuamente entra solvente en la celda de extracción, por lo que se incrementa considerablemente la eficacia y el rendimiento en la extracción, en comparación con un procedimiento estático (Lin y col., 2009; Wang y col., 2011).

La PLE ofrece diversas ventajas con respecto a los métodos tradicionales de extracción. Entre ellas se puede destacar la utilización de un menor volumen de disolvente, la rapidez y su automatización. Además de estas ventajas, durante todo el proceso de extracción la muestra se encuentra protegida de la luz y del oxígeno (Herrero y col., 2013). En cuanto a los disolventes utilizados es común y preferible el uso de disolventes considerados GRAS, como el agua y el etanol, frente a la utilización de otros disolventes más tóxicos como el éter de petróleo y el diclorometano (Skalicka-Wozniak y Glowniak, 2012).

En el caso del agua, cuya constante dieléctrica es elevada a temperatura ambiente (en torno a 80), un incremento de temperatura (hasta 250 °C) y de presión, manteniendo el estado líquido, reduce la constante dieléctrica a 25, similar a la de los disolventes orgánicos. Las propiedades del agua en condiciones subcríticas, le convierten en un buen solvente para la extracción de compuestos poco polares, además de ser una excelente alternativa al empleo de disolventes orgánicos. En los casos en los que interesa la extracción de compuestos no polares, como volátiles o aceites esenciales, para conseguir un mayor rendimiento se hace necesaria la incorporación de otros disolventes, como puede ser el hexano (dos Santos Freitas y col., 2008; Zaibunnisa y col., 2009). En los últimos años se están desarrollando procedimientos de extracción empleando lactato de etilo, un disolvente con baja polaridad, que además de ser considerado GRAS, combinado con etanol tiene numerosas aplicaciones (Villanueva y col., 2011; Bermejo y col., 2012; Golmakani y col., 2012).

Un equipo de extracción por líquidos presurizados debe contener el equipamiento mínimo que se muestra en la figura 14. El equipo consta de unos reservorios que proporcionan los disolventes al sistema, y que son introducidos mediante una bomba, que incrementa la presión previamente a su entrada en la celda de extracción. La celda se rellena con la matriz que se va a emplear para la extracción y su ubicación en el interior de un horno, permite el incremento de la temperatura en su interior. Tras el proceso de extracción, el extracto se recoge en un reservorio. Adicionalmente puede inyectarse nitrógeno en el sistema, para su purga, una vez finalizada la extracción.

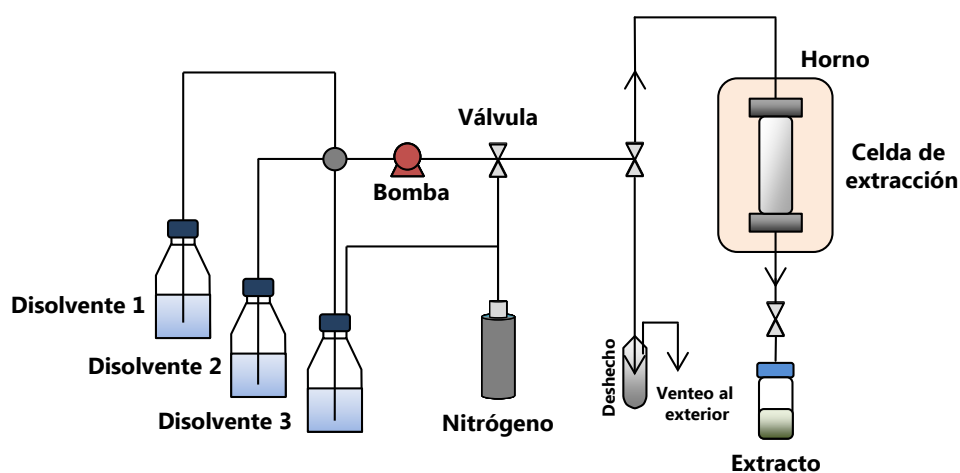


Figura 14: Esquema de un equipo de extracción con líquidos presurizados

En cuanto a las aplicaciones de esta técnica, habitualmente se ha empleado en la extracción de contaminantes de alimentos o muestras naturales como polihidroxicanoatos (PAH), bifenilos policlorados (PCBs) y pesticidas (Curren y King, 2001a; Curren y King, 2001b; Mendiola y col., 2007), además de ser utilizada en la extracción de compuestos bioactivos de matrices de origen natural. Es común su empleo en la extracción de antioxidantes, como compuestos fenólicos a partir de orégano (Miron y col., 2011), romero (Borras-Linares y col., 2011), cebolla (Soltoft y col., 2009), piel de uva (Polovka y col., 2011) y carotenoides, a partir de restos de zanahorias (Mustafa y col., 2012), algas (Herrero y col., 2007), semillas o nueces (Delgado-Zamarreño y col., 2009).

2



Materiales y métodos

2.1 Materias primas

Las materias primas utilizadas en este trabajo (tabla 3) son plantas comerciales seleccionadas y estandarizadas y que han sido suministradas por una empresa dedicada a la producción de plantas medicinales, semillas culinarias, derivados de agrios y especias (Murciana de Herboristerías, Murcia, España).

Tabla 3: Especies de plantas empleadas

Nombre común	Familia	Género	Especie
Orégano	<i>Labiatae</i>	<i>Origanum</i>	<i>vulgare</i> L.
Salvia	<i>Labiatae</i>	<i>Salvia</i>	<i>officinalis</i> L.
Tomillo	<i>Labiatae</i>	<i>Thymus</i>	<i>vulgaris</i> L.
Albahaca	<i>Labiatae</i>	<i>Ocimum</i>	<i>basilicum</i> L.
Mejorana	<i>Labiatae</i>	<i>Origanum</i>	<i>majorana</i> L.
Romero	<i>Labiatae</i>	<i>Rosmarinus</i>	<i>officinalis</i> L.

Las hojas secas de estas plantas se han sometido a una molienda criogénica (Retsch Grindomix GM 200, Haan, Alemania). Posteriormente, el tamaño de partícula se ha determinado mediante el paso del material molido a través de tamices con un entramado entre 500-1000 μm (CISA, Barcelona, España). Las muestras de todas las especies se han almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

2.2 Extracción con fluidos supercríticos

Desde hace tiempo la literatura ha indicado que determinados extractos naturales obtenidos a partir de plantas mediante extracción con CO_2 supercrítico poseen una actividad biológica superior a los obtenidos mediante extracción con disolventes orgánicos (Djarmati y col., 1991). Por este motivo se aplicó en este trabajo de Tesis Doctoral la extracción supercrítica, persiguiendo alcanzar la mayor actividad posible en los extractos estudiados.

Hojas secas y molidas de las seis especies de plantas estudiadas (orégano, salvia, tomillo, albahaca, mejorana y romero), se han sometido a la tecnología de SFE, con CO_2 (Air Liquid, Madrid, España) para obtener los correspondientes extractos. Se ha utilizado

un equipo a piloto modelo SF2000 (Thar Technology, Pittsburgh, EEUU), que se muestra en la figura 15.

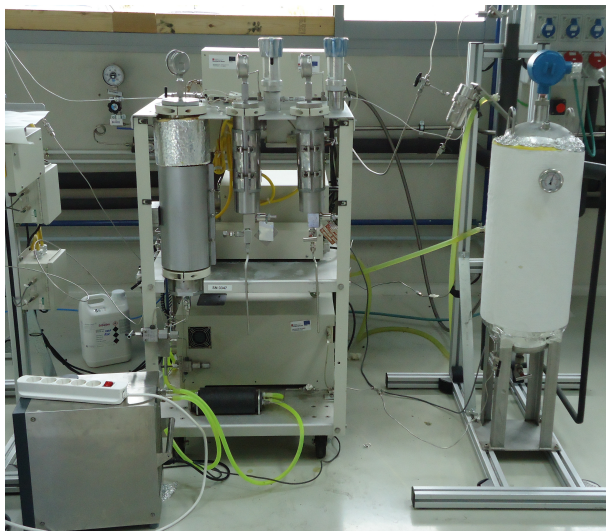


Figura 15: Fotografía del equipo de extracción con fluidos supercríticos (Thar SF2000).

La planta de extracción, detallada en el esquema de la figura 16, está formada por una celda de extracción (CE) con 2 L de capacidad que consta de controles independientes de presión con un BPR (*Back Pressure Regulator*) y temperatura y en cuyo interior se aloja una cesta para facilitar el proceso de carga y descarga. Dos separadores cilíndricos (S1 y S2), con capacidad de 0,5 L cada uno y control independiente de presión (válvulas manuales V_1 y V_2) y temperatura, permiten recoger el producto de la extracción, pudiéndose realizar el fraccionamiento variando las condiciones de presión. Además, el equipo consta de dos bombas, la principal (P1) es la que se encarga de bombear el CO_2 y se mantiene refrigerada por un *chiller* (C). La segunda de las bombas del equipo (P2) permite la adición de un co-solvente, cuya mezcla adecuada con el CO_2 se consigue mediante un mezclador (M). Previo a la celda de extracción existe un intercambiador de calor (HE) que permite modificar la temperatura y asegurar que el fluido, bien CO_2 o CO_2 con co-solvente, se encuentre en las condiciones operativas adecuadas antes de su entrada en la celda. Finalmente, el equipo dispone de un sistema de recirculación de CO_2 con un tanque (T) para suministrar CO_2 y recogerlo tras su descompresión. En la salida del S2 existe un filtro (F) que retiene las impurezas arrastradas por el CO_2 y un condensador (CS) que disminuye su temperatura antes de entrar al tanque. La planta dispone de un sistema informatizado de control.

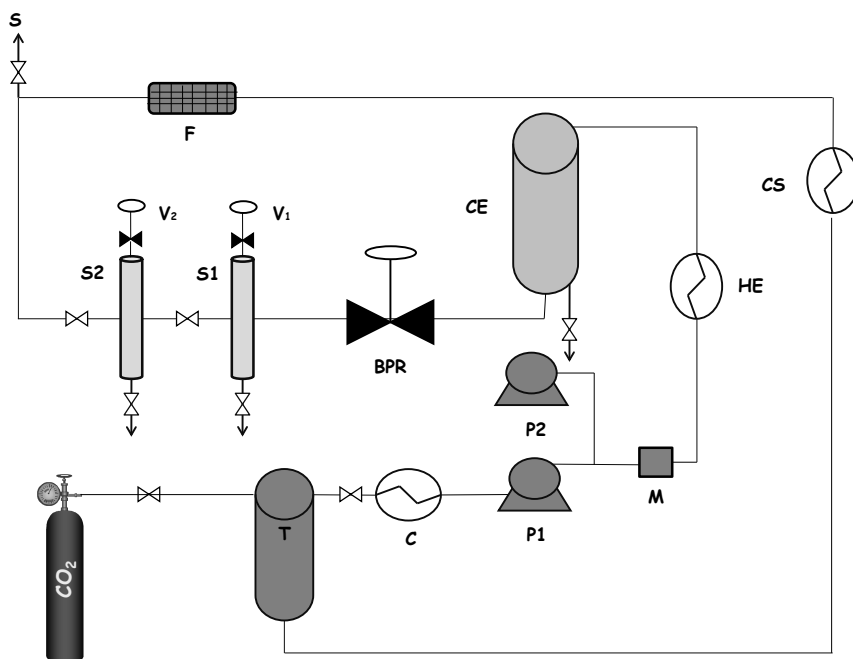


Figura 16: Esquema de la planta de SFE empleada

La obtención de los extractos de cada especie de planta se ha llevado a cabo mediante un proceso desarrollado y optimizado por el Grupo de Investigación en el que se ha llevado a cabo el trabajo de la presente Tesis Doctoral (García-Risco y col., 2011a). Las condiciones operativas han sido las siguientes: se han introducido en la celda de extracción 0,5 kg del material molido y tamizado con tamaño de partícula entre 500-1000 μm , el flujo de CO_2 empleado ha sido de 60 g/min, manteniéndose en la celda de extracción la temperatura a 40 $^{\circ}\text{C}$ y la presión a 30 MPa. El tiempo de procesado ha sido de 6 horas. De cada especie de planta se ha obtenido un único extracto mediante descompresión hasta presión atmosférica en el S1. Una vez obtenidos los extractos, se han mantenido a -20°C .

Una variable importante en la extracción supercrítica es el uso de un co-solvente polar, bombeado al sistema por la segunda bomba P2, con la que está equipada la planta de extracción. Puesto que la incorporación de co-solventes modifica sustancialmente la polaridad del fluido supercrítico, es previsible que se obtengan extractos de diferente composición.

Este tipo de extracción se ha empleado para la obtención de un segundo tipo de extracto supercrítico de romero, denominado romero B (el romero extraído sin emplear co-solvente se define con la nomenclatura A). En este caso se ha incorporado un 5% de etanol (Panreac, Barcelona, España) como co-solvente, la presión se ha fijado en 15 MPa durante las 3 horas de extracción y la temperatura en 40 °C. Posteriormente, se ha eliminado el etanol del extracto empleando un rotavapor R-210 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Una vez obtenido el extracto, se ha mantenido almacenado a – 20 °C.

2.3 Extracción con líquidos presurizados

Dados los altos costes productivos asociados tradicionalmente a la tecnología de fluidos supercríticos, se ha estimado conveniente comparar las características de extractos obtenidos mediante otra tecnología de extracción, que por sus características podría resultar idónea y cuyos costes operativos son menores, se trata de la PLE. Esta tecnología se ha aplicado para obtener extractos de albahaca, mejorana y romero y poder comparar sus propiedades con los extractos de las mismas plantas obtenidos por SFE.

Para llevar a cabo este segundo tipo de extracción, se han utilizado como disolventes: agua, etanol y una mezcla de etanol y agua 1:1. El equipo empleado ha sido el ASE 350 de Dionex Corp. (Sunnyvale, EEUU), que incorpora una unidad de control de disolventes para la obtención de mezclas de forma automática (figura 17).

De cada especie de las plantas empleadas se han obtenido 3 extractos diferentes.



Figura 17: Fotografía del equipo de extracción con líquidos presurizados (ASE 350 Dionex Corp. Sunnyvale, EEUU).

En el interior de las celdas de extracción, de 10 mL de volumen, se ha incorporado 1 g de cada una de las muestras de las seis especies de plantas empleadas. A continuación, la celda se ha llenado con disolvente hasta alcanzar una presión de 10 MPa y se ha incrementado la temperatura en el interior de la celda hasta alcanzar los 150 °C, el denominado *heat-up time* de 7 minutos. Las condiciones de presión y temperatura seleccionadas aseguraron el estado líquido de los disolventes. El tiempo de extracción ha sido de 10 minutos. Transcurrida la extracción, el disolvente se ha recogido en un reservorio y se ha lavado la celda con el mismo disolvente que se ha empleado en la extracción, purgándose el sistema a continuación con N₂ hasta su completa despresurización.

Una vez obtenidos los extractos por PLE, se ha realizado una etapa de eliminación de los disolventes empleados. En el caso de las extracciones con etanol y la mezcla etanol:agua, se ha evaporado el etanol utilizando un rotavapor. Para los extractos obtenidos con agua y con objeto de eliminar el agua residual de los extractos de la mezcla etanol:agua, se han congelado las muestras a – 20 °C y a continuación se ha realizado un proceso de liofilización con un equipo LyoQuest (Telstar Corporation, Madrid, España). Los extractos secos se han mantenido almacenados a – 20 °C.

2.4 Determinación de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con fluidos supercríticos y presurizados se ha determinado empleando el método ABTS (Re y col., 1999). Este método se basa en la generación de radicales ABTS^{•+} (figura 18) y se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante del extracto.

La obtención de radicales es previa al ensayo, mediante la oxidación del ABTS con persulfato potásico (K₂S₂O₈), obteniendo un producto coloreado que presenta un máximo de absorción a 734 nm, ABTS^{•+}. Posteriormente, al adicionar compuestos antioxidantes durante el ensayo, se reducen los radicales de ABTS^{•+} generados con K₂S₂O₈, produciendo simultáneamente una reducción del color y la consiguiente disminución en los valores de absorbancia a 734 nm.

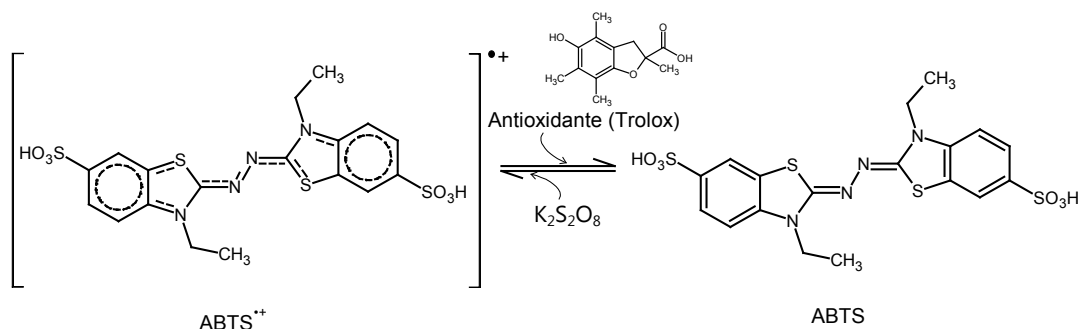


Figura 18: Reacción que se produce en el ensayo de medida de la actividad antioxidante con el radical $ABTS^{\bullet+}$.

Concretamente, el catión radical $ABTS^{\bullet+}$ se ha generado haciendo reaccionar una disolución 7 mM de ABTS, con 2,45 mM de $K_2S_2O_8$ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (concentraciones finales de reacción) durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Esta solución de radical $ABTS^{\bullet+}$ se ha diluido con etanol hasta lograr una absorbancia en torno a 0,70 UA, medida a 734 nm. Posteriormente, se han añadido 10 μ L del extracto disuelto a diferentes concentraciones (empleando un mínimo de 4 concentraciones diferentes) a 990 μ L de la disolución diluida de $ABTS^{\bullet+}$. La mezcla de reacción se ha dejado incubar a temperatura ambiente y en ausencia de luz, hasta la estabilización de la absorbancia, tiempo tras el cual se ha medido la absorbancia a 734 nm. El trolox se ha usado como patrón de referencia, de forma que los resultados se han expresado como valor TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) en mmol Trolox/g extracto. De esta manera, un mayor valor TEAC supone una mayor capacidad antioxidante del extracto. Como ya se ha mencionado, estos valores se han determinado para al menos cuatro concentraciones diferentes de cada uno de los extractos estudiados, proporcionando una respuesta lineal. Además, todos los análisis se han llevado a cabo por triplicado.

2.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria

2.5.1 Cultivos celulares

La actividad antiinflamatoria de los extractos de plantas se ha estudiado en la línea celular de monocitos THP-1 (TIB-202, American Type Culture Collection (ATCC), Barcelona, España).

Durante el mantenimiento y la expansión del cultivo celular se ha empleado como medio de cultivo el RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% de HEPES, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Madrid, España) y 0,05 mM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El cultivo de los monocitos en suspensión se ha mantenido a una densidad en torno a $2-9 \times 10^5$ células/mL en un incubador (Binder, Tuttlingen, Alemania), en condiciones constantes de temperatura, 37 °C y 5% de CO₂. Para los ensayos realizados, se han empleado células con hasta 25 reemplazos de medio de cultivo.

Con el fin de diferenciar los monocitos a macrófagos, a la suspensión celular se le ha adicionado PMA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 100 ng/mL, siendo necesario un periodo de incubación hasta la completa diferenciación de 48 horas (Takashiba y col., 1999).

2.5.2 Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se han llevado a cabo empleando el método de respiración mitocondrial dependiente de la reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, que transforma el MTT en un compuesto coloreado azul, el formazán. La cantidad de células viables va a ser, por tanto, proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983).

Para determinar la toxicidad celular de todos los extractos y patrones empleados se han utilizado placas de 24 pocillos, con 5×10^5 macrófagos por pocillo, donde se han añadido distintas concentraciones de los extractos y patrones empleados a lo largo del estudio. El tratamiento se ha mantenido durante 24 horas y transcurridas éstas, se ha

retirado el medio de cultivo de los pocillos y a continuación se han añadido 0,5 mL de una disolución de 0,5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, Madrid, España), que se ha mantenido en contacto con las células durante 3 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Con el propósito de determinar la cantidad de formazán producido por las células, se ha llevado a cabo su lisis mediante el empleo de una solución compuesta por la mezcla de dimetil sulfoxido (DMSO) (Panreac, Barcelona, España) y etanol en proporción 1:1, midiéndose a continuación la absorbancia de cada uno de los pocillos a 540 nm en un lector de microplacas (Sunrise Remote, Tecan, Barcelona, España). La densidad óptica del formazán producido por las células en los pocillos control, donde no se ha añadido ningún extracto, se determina como la máxima viabilidad, comparándose con la absorbancia del resto de tratamientos.

2.5.3 Medida de la actividad antiinflamatoria

Para determinar la actividad antiinflamatoria se han empleado macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1 como se ha indicado previamente.

Con objeto de simular en los macrófagos una situación patológica de inflamación, se han llevado a cabo dos procedimientos diferentes. Por un lado, se han adicionado 0,05 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Kim y col., 2010) y por otro lado, un segundo modelo de inflamación dependiente de oxidación (Poli y col., 2009). En este segundo modelo, se han incorporado LDLox a las células. Las LDL empleadas han sido donadas por el Servicio de Bioquímica e Investigación del Hospital Ramón y Cajal (Madrid, España). Inicialmente a estas LDL se las ha eliminado el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), mediante un proceso de diálisis en PBS (Invitrogen, Madrid, España), a 4 °C y en agitación, a lo largo de una noche (Fuhrman y col., 2008), empleándose para ello membranas de diálisis de 20000 Da con 1 mL de volumen (Float-A-Lyzer G-2, Spectrum Laboratories Inc., Francia). A continuación, se han oxidado las LDL siguiendo el protocolo descrito por Steinbrecher (1987) que, de forma resumida, ha consistido en preparar una disolución de LDL con 5 µM de CuSO₄ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) e incubarlo durante 3 horas en agitación a 37 °C. Con el propósito de determinar la correcta oxidación de las LDL, una vez finalizado el periodo de incubación, se ha determinado el grado de oxidación mediante el método TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), empleando la modificación del método descrito por Yancey y Jerome (1998); los resultados se expresan como equivalentes de malondialdehído (MDA) en nmoles

MDA/mg LDL. Una vez comprobada la correcta oxidación de las LDL, se adiciona al medio de cultivo 75 µg/mL de LDLox. Los macrófagos estimulados tanto con LPS como con LDLox forman los denominados controles positivos. En este sentido, los controles negativos de los ensayos están formados por macrófagos sin estimular, que representarían la situación basal. Los distintos extractos y patrones se adicionan a la vez que el LPS o las LDLox, manteniéndose los tratamientos durante 6, 12 ó 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurridos los tiempos de incubación, se ha recogido el medio de cultivo y se ha almacenado a – 20 °C para la posterior determinación de la secreción de citoquinas. Paralelamente, se han recogido las células con 400 µL de Trizol® (Invitrogen, Madrid, España) y se han almacenado a – 80 °C para la posterior extracción del ARN mensajero.

2.5.3.1 Ensayo ELISA para la cuantificación de citoquinas

La cuantificación de la concentración de citoquinas secretadas por los macrófagos al medio de cultivo, tras el tratamiento con los extractos o patrones, y activados bien con LDLox o con LPS, se ha determinado empleando el enzimoimmunoensayo (ELISA). Con este propósito se han utilizado kit de ELISA tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, Madrid, España). En este ensayo se ha determinado la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10. Para ello se han utilizado placas de 96 pocillos (Microtest, BD Falcon, Madrid, España), tratadas específicamente para permitir la adhesión del anticuerpo primario de cada una de las citoquinas cuya concentración ha sido determinada. A cada pocillo se añadieron 100 µL de la solución de anticuerpo primario incubándose durante la noche a 4 °C. A continuación, se lava la placa y se acondiciona durante una hora. Posteriormente, se han adicionado en la placa las muestras que forman las curvas patrón de las distintas citoquinas a estudiar (100 µL) y las muestras procedentes de los ensayos de actividad antiinflamatoria. De las muestras procedentes del modelo de inflamación utilizando macrófagos activados por LPS se han incorporado 10 µL para la determinación de TNF- α , 10 µL para IL-1 β , 20 µL para IL-6 y 100 µL para IL-10, mientras que para el modelo dependiente de oxidación los volúmenes han sido de 40 µL para TNF- α , 60 µL para IL-1 β , 80 µL para IL-6 y 100 µL para IL-10.

Las muestras y las rectas patrón se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo, se han realizado los lavados en las placas y se han incorporado 100 µL de la solución de anticuerpo secundario junto con la enzima que va a permitir la cuantificación de la citoquinas. Tras una hora de incubación en oscuridad del

anticuerpo secundario y la enzima, se realiza una nueva etapa de lavado y se incorporan 100 μ L de la solución de sustrato de la enzima, que da lugar a un compuesto coloreado. Tras 30 minutos de tiempo de reacción, ésta se detiene incorporando en los pocillos 50 μ L de H_3PO_4 1M (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Finalmente, se ha determinado la absorbancia de los pocillos a 450 nm, con una corrección a 570 nm en un lector de microplacas. Los resultados se cuantificaron como pg de citoquina/mL de medio de cultivo. Todos los análisis se han llevado a cabo por triplicado.

2.5.3.2 Cuantificación de la expresión génica

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica de las citoquinas $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6 e IL-10 y la enzima COX-2, inicialmente se ha aislado el ARN total de los macrófagos siguiendo las instrucciones del fabricante del reactivo Trizol[®]. Las muestras de células recogidas en Trizol[®] y almacenadas a -80°C , procedentes de los ensayos previos se han descongelado e incubado a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se ha incorporado cloroformo (Panreac, Barcelona, España) y tras centrifugar las muestras a 12000 g (Hettich, Universal 320-R, Madrid, España) durante 15 minutos a 4°C se ha observado la separación en tres fases, una fase de fenol-cloroformo donde queda disuelto el ADN de las células, una fase intermedia proteica y una tercera fase acuosa donde queda disuelto el ARN. Tras recoger la fase acuosa, se ha añadido isopropanol (Panreac, Barcelona, España), se han incubado las muestras durante 10 minutos para precipitar el ARN y se han centrifugado de nuevo durante 10 minutos a 4°C y 1200 g. El ARN precipitado se ha lavado con etanol al 75% y a continuación se ha secado para disolverlo en agua e incubarlo a 60°C durante 10 minutos. Finalmente, se ha determinado la concentración del ARN empleando un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Madrid, España) y se han almacenado las muestras hasta su posterior uso a -80°C .

En un paso posterior del procedimiento de cuantificación de la expresión génica, se ha sintetizado la cadena de ADN copia mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Para ello se ha utilizado el *kit High Capacity Archive* (Applied Biosystems, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, el último paso en la cuantificación de la expresión génica ha sido la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, utilizando

sondas tipo TaqMan[®], según las indicaciones del fabricante, en un equipo ViiA[™]7 (Applied Biosystems, Madrid, España). Las sondas TaqMan[®] que se ha empleado para determinar la expresión génica de los distintos genes quedan recogidas en la tabla 4.

Tabla 4: Sondas Taqman[®] empleadas en la determinación de la expresión génica

Gen	Código TaqMan [®]
TNF- α	Hs00174128_m1
IL-1 β	Hs99999029_m1
IL-6	Hs00174131_m1
IL-10	Hs99999035_m1
COX-2	Hs00153133_m1
18S	Hs99999901_s1

Todos los ensayos de expresión génica se han realizado en placas de 384 pocillos, empleándose como gen control de expresión constitutiva el que codifica 18S. Los resultados de expresión se han expresado como cuantificación relativa, según el parámetro RQ, donde el valor obtenido es directamente proporcional a la transcripción del gen. El valor RQ de 1 ha sido asignado al resultado de la expresión génica en células en situación basal, es decir, células no activadas por ninguno de los dos procedimientos empleados a lo largo de esta memoria, comparándose este resultado con el resto de las muestras. Todos los análisis se han llevado a cabo por triplicado.

2.6 Caracterización química

2.6.1 Análisis mediante cromatografía de líquidos

Los extractos secos obtenidos por SFE y PLE de las distintas plantas se han disuelto en etanol, como etapa previa al análisis de su contenido en compuestos fenólicos. Este análisis se ha llevado a cabo por HPLC con detector de haz de diodos (DAD), en un equipo Varian Pro-Star con una columna Microsorb MV C18 (Varian, Madrid, España) de 25 cm x 4,6 mm y con tamaño de partícula de 5 μ m. El análisis se ha basado en el trabajo publicado por Almela y col. (2006). En la separación se ha empleado como fase A, 100% de acetonitrilo (Panreac, Barcelona, España) y como fase B agua acidulada con 0,1% de H₃PO₄ (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El gradiente aplicado, con un flujo del disolvente de 0,7 mL/min, supone un 23% de fase A durante 8 minutos, de un 23% a 77% de A

durante 17 minutos y 15 minutos en condiciones isocráticas (77% de A). Los 5 últimos minutos se han utilizado para alcanzar las condiciones iniciales. Finalmente, se ha empleado el detector de DAD, midiéndose la absorbancia a 230 y 280 nm. Todas las muestras se han inyectado por duplicado, siendo la media de la desviación estándar $\pm 0,13\%$ y el volumen de inyección 20 μL .

La identificación de los compuestos fenólicos se ha realizado mediante la comparación de los tiempos de retención y sus espectros UV-Vis, con aquellos obtenidos para los patrones comerciales de ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

2.6.2 Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La caracterización de los compuestos volátiles presentes en los extractos de las plantas obtenidos por SFE y PLE se ha determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); para ello se ha empleado un cromatógrafo de gases Agilent 7890A System (Madrid, España), equipado con un inyector *split/splitless*, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C-VLMSD (Agilent Technologies, Madrid, España); asimismo, se ha utilizado una columna capilar Agilent 19091S-433, de 30 m x 0,25 mm d.i. y 0,5 μm de espesor de fase (Agilent Technologies, Madrid, España). Como fase móvil se ha emplea helio (Air Liquid, Madrid, España) 96,99% de pureza con un flujo de 2,4 mL/min; por su parte, la temperatura inicial del horno se mantiene a 60°C durante 4 min, seguida de un incremento hasta 106 °C a razón de 2,5 °C/min; a continuación, se eleva nuevamente la temperatura hasta alcanzar 130 °C bajo un gradiente de 1 °C/min; finalmente la temperatura asciende a 250 °C con una rampa de 20 °C/min, manteniéndose constante durante 10 min; en consecuencia, el tiempo total de análisis asciende a 64,8 min. Completan las condiciones de trabajo la inyección de 1 μL de muestra en modo *split* (10:1), una presión de columna generada al paso de la fase móvil de 20283 psi y una temperatura de inyector de 250 °C; respecto al espectrómetro de masas, se utiliza en modo TIC, estando comprendidas las masas analizadas en valores de 40-500 uma. Los compuestos se identifican por comparación con los patrones y estudio de los espectros de masas generados por las bibliotecas *mainlib*, *replib* y *nist-salts*. Todos los análisis se han realizado por duplicado, siendo la media de la desviación estándar $\pm 0,08\%$.

2.7 Medida de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero

2.7.1 Medida de la absorción intestinal *in vitro*

La determinación de la absorción intestinal del extracto supercrítico de romero obtenido empleando un 5% de etanol como co-solvente durante la extracción (romero B), se ha llevado a cabo utilizando la línea celular Caco-2 (Invitrogen, Barcelona, España), procedente de adenocarcinoma de colon humano. Las células se han mantenido en el medio Eagle's modificado Dubelcco's (DMEM) con un alto contenido en glucosa (4,5 g/L) y suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 1% de HEPES y 2 mM de L-glutamina.

En una etapa previa a la realización de los ensayos de absorción, se ha determinado la toxicidad del extracto de romero obtenido por SFE en monocapas de células Caco-2, empleándose un método análogo al descrito previamente para la determinación de la toxicidad de los extractos frente a los macrófagos procedentes de la línea celular THP-1, el método dependiente de la reducción del MTT.

Para los ensayos de absorción se han empleado células Caco-2 entre los pases 30 y 45, que se cultivan en placas especiales de 12 pocillos (Transwell® Costar, Corning, Madrid, España). Estas placas especiales constan de un cestillo interior con una membrana semipermeable de poliéster en el fondo, dentro de un pocillo de mayor volumen, simulando la zona apical y basolateral de las monocapas de enterocitos intestinales, una vez que las células recubren por completo la superficie de la membrana (figura 19).

Las células Caco-2 se han sembrado con una densidad de 2×10^4 células sobre la membrana contenida en el soporte de cada pocillo (tamaño de poro 0,4 µm, 12 mm de diámetro y 1,1 cm² de superficie de crecimiento), añadiendo medio de cultivo en la zona apical, 500 µL y en la basolateral, 1,5 mL. El medio de cultivo se ha reemplazado cada dos días, permitiendo que las células crezcan sobre la membrana cubriendo toda su superficie, en monocapa, y que posteriormente se diferencien formando el borde en cepillo característico de los enterocitos intestinales. Este proceso ha durado aproximadamente unos 21 días.

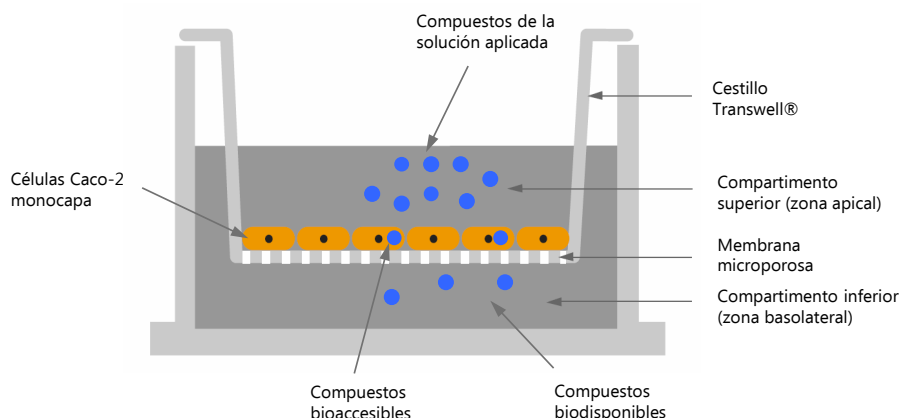


Figura 19: Esquema de un pocillo de las placas Transwell® donde las células Caco-2 crecen sobre una membrana cubriendo toda la superficie y dejando separados los compartimentos apical y basolateral.

En una etapa previa a la realización de los ensayos de absorción, se ha evaluado la integridad de la monocapa de células midiendo el potencial transmembrana (TEER) y su diferenciación (formación del borde de cepillo característico de los enterocitos), mediante la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP). Únicamente se han realizado los ensayos de absorción cuando la medida del TEER ha sido superior a $250 \Omega\text{cm}^2$ y los valores de ALP en torno a 12-14 mUI/mg proteína (Soler-Rivas y col., 2010).

- Medida del potencial transmembrana

La medida del TEER se ha empleado para determinar la integridad de las monocapas celulares mediante el uso de un aparato específico, que consiste en unos electrodos especiales acoplados a un voltímetro (Evon World Precision Instruments, Sarasota, FL, EEUU). Estos electrodos, por su diferente longitud, permiten que el electrodo más largo se coloque sobre el fondo del compartimento basolateral, mientras que el electrodo más corto, se introduce en el compartimento apical, no rozando la monocapa de células (figura 20). Previamente a la realización de la medida, los electrodos se han esterilizado por inmersión en una solución de etanol al 70% y posteriormente, para equilibrarlos, se han introducido en una solución esterilizada de KCl 0,15 M. Como control se mide el TEER de un pocillo que sólo contiene medio de cultivo (sin células), los valores del TEER se han expresado como resistencia por unidad de área, ya que ésta es independiente del área de la membrana utilizada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resistencia monocapa} = \text{Resistencia total} - \text{Resistencia control}$$

Donde Resistencia total es el valor obtenido en un pocillo que contiene células Caco-2 con su correspondiente medio de cultivo y Resistencia control es el obtenido en un pocillo donde sólo hay medio de cultivo. Así, Resistencia monocapa es el valor debido sólo a la monocapa de células.

$$\text{Resistencia monocapa} \times \text{Área de la membrana} = \text{Resistencia monocapa} \times \pi d^2/4 \text{ (}\Omega\text{cm}^2\text{)}$$

En este trabajo, las membranas utilizadas han tenido un diámetro (d) de 1,2 cm y los pocillos que contienen únicamente medio de cultivo han presentado una resistencia de 80-85 Ω . Por ello, se ha considerado que las monocapas están íntegras cuando los valores de TEER obtenidos han sido superiores a 250 Ωcm^2 .

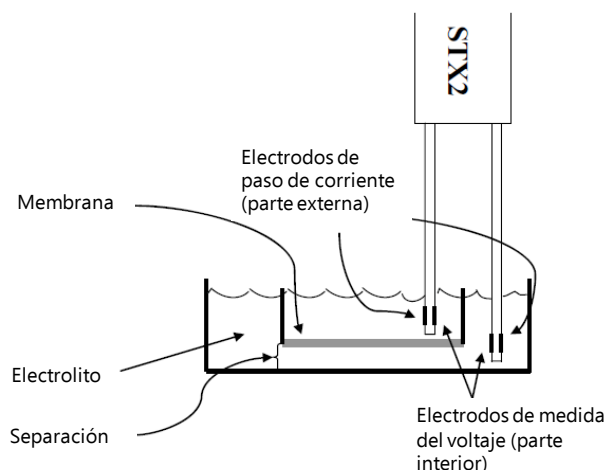


Figura 20: Esquema de la medida del potencial transmembrana.

- Medida de la actividad fosfatasa alcalina

La enzima fosfatasa alcalina (ALP) cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato en medios alcalinos, dando lugar a la formación de radicales orgánicos y fosfato inorgánico y se expresa en la cara apical de los enterocitos diferenciados (Matsumoto y col., 1990). La medida de la actividad de esta enzima *in vitro* se ha realizado siguiendo el método recomendado por la IFCC (*Internacional Federation of Clinical Chemistry*) (Tietz y col.,

1983), donde se utiliza como sustrato el p-nitrofenol y fosfato, teniendo lugar la reacción a pH básico. El p-nitrofenil es un compuesto coloreado (amarillo) que absorbe a 405 nm.

Como la actividad de la enzima aumenta conforme lo hace el número de células, la ALP se expresa dividida por la concentración de proteínas totales, usando el nivel de proteínas como un valor directamente relacionado con el número de células. Como paso previo a la realización del ensayo, las células que han crecido sobre la membrana se han roto mediante el uso de una solución de Tritón X 0,1% en PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, se ha recogido el resultado de la rotura celular en 400 µL de PBS y se ha mezclado en un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, España) durante 20 segundos, a continuación se ha colocado en hielo otros 20 segundos y se ha vuelto a introducir en el baño de ultrasonidos repitiendo la operación un total de 3 veces. En pasos posteriores, se ha agitado durante 1 min, se ha centrifugado durante 1 min a 12000 rpm y se ha recogido el sobrenadante para los ensayos de ALP y proteínas (Dihal y col., 2006).

Para cuantificar la cantidad de proteínas se han tomado 30 µL del sobrenadante de las células mezclado en una cubeta de 1 mL con 970 µL del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Posteriormente se ha medido su absorbancia a 595 nm tras 5 min, tal como se ha descrito previamente. La determinación se ha realizado por duplicado.

Para la determinación de la actividad ALP se han tomado 200 µL de sobrenadante y se han mezclado vigorosamente en una cubeta de espectrofotómetro de 1 mL con 700 µL de un tampón Tris-HCl 1M pH 8,0 y 100 µL de la solución de p-nitrofenil fosfato (p-NPP) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Transcurridos 4 min, se ha medido su absorbancia a 405 nm (Bestwick y Milne, 2000), realizándose la determinación por duplicado. La actividad se ha expresado como UI/L o UI/mL según la fórmula:

$$\text{Actividad ALP (UI/mL)} = \frac{(\text{Abs}_{4\text{min}} - \text{Abs}_{0\text{min}}) + V (\text{cubeta})}{\text{Tiempo} \times \varepsilon \times l \times V_m (\text{muestra})} = \frac{(\text{Abs}_{4\text{min}} - \text{Abs}_{0\text{min}}) + 1}{4 \times 18,75 \times 1}$$

donde:

ε : coeficiente de extinción del producto de reacción (p-nitrofenol); $\varepsilon = 18,75 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$;

V: Volumen de reacción (mL); Vm: Volumen de muestra aplicada (mL);

l: Longitud de la cubeta (cm).

También se puede expresar como $\text{mUI/mL} = \text{UI/mL} \times 1000$ y se suele referir a los mg de proteína medidos.

$$\text{Actividad ALP (mUI/mg proteína)} = \frac{\text{Actividad ALP (mUI/mL)}}{\text{Conc. proteínas (mg/mL)}}$$

En los cultivos realizados en este trabajo el aumento del TEER ha coincidido con el incremento de actividad de la fosfatasa alcalina de las células.

Una vez que se ha comprobado la integridad de la membrana celular y la diferenciación de las células a enterocitos, se ha añadido en la zona apical del pocillo el extracto supercrítico o los patrones cuya biodisponibilidad se ha medido, en un volumen final de 500 μL , añadiéndose en la zona basolateral 1,5 mL de medio de cultivo. Estas placas se han incubado a 37 °C y 5% de CO_2 durante 2, 4, 8 y 12 horas. Durante el tiempo de incubación se han realizado medidas del TEER para comprobar la integridad de la monocapa de células; transcurrido el mismo, se ha recogido el medio de cultivo de las zonas apical y basolateral de los pocillos, así como las células de la membranas de los pocillos mediante el empleo de PBS y se han almacenado a – 20 °C para su posterior análisis.

2.7.2 Determinación de la cantidad de ácido carnósico y carnosol en las fracciones biodisponible y bioaccesible

En las muestras obtenidas tras los ensayos de la medida de la absorción intestinal *in vitro* del extracto de romero B, se ha cuantificado el contenido en ácido carnósico y carnosol. De esta forma, se ha podido determinar la fracción que atraviesa la monocapa de células Caco-2, disuelta en el medio de la zona basolateral, así como en la fracción

bioaccesible, que se corresponde con el ácido carnósico y carnosol en el interior de las células de la monocapa, tras los periodos de incubación.

En la primera etapa de este proceso, las muestras del medio de cultivo recogidas de las zonas apical y basolateral de los pocillos de las placas Transwell®, se han sometido a un proceso de liofilización. A continuación, se han adicionado 400 µL de etanol, mezclándose en un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, España). Finalmente, se ha recogido el etanol y se han centrifugado las muestras a 5000 rpm para eliminar los sólidos en suspensión, realizándose a continuación su caracterización química.

Las células procedentes de las membranas de los pocillos, se han recogido en PBS, extrayéndose el ácido carnósico y el carnosol presente en el interior de las células. Para ello, inicialmente se han centrifugado las muestras a 1500 rpm, descartando el sobrenadante y mezclando a continuación el precipitado con 200 µL de acetona (Panreac, Barcelona, España), empleando un baño de ultrasonidos para facilitar la rotura de las células. Posteriormente, se ha repetido la centrifugación, se ha recogido el sobrenadante y se ha adicionado acetona para realizar de nuevo el proceso de extracción con ultrasonidos. La acetona obtenida en los dos procesos de extracción se ha secado posteriormente bajo N₂ y se ha disuelto el sólido restante en etanol hasta su posterior análisis.

El análisis de las muestras se ha realizado empleando la técnica UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS). Para ello se ha empleado un cromatógrafo de líquidos Accela (Thermo Scientific, Madrid, España), equipado con un detector de haz de diodos (DAD), que ha registrado los espectros entre 200 y 450 nm. El cromatógrafo estaba acoplado mediante una fuente de ionización tipo *Electrospray* (ESI) a un analizador de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum (Thermo Scientific, Madrid, España). Para el análisis se ha utilizado una columna *Hypersil Gold* (50 mm × 2,1 mm, con partículas de 1,9 µm de diámetro) (Thermo Scientific, Madrid, España), una fase A compuesta de acetonitrilo (0,1% ácido fórmico) y como fase B, agua (0,1% ácido fórmico). Las fases móviles han eluido siguiendo este gradiente: 0 min, 95% de B; 0,35 min, 95% de B; 3,5 min, 40% de B; 6,2 min, 5% de B; 6,5 min; 5% de B; 7min, 95% de B y 9 min, 95% B. La velocidad del flujo ha sido de 0,4 mL/min y el volumen de inyección de 10 µL. La cuantificación del ácido carnósico y el carnosol se ha realizado por el método MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) en modo

negativo, teniendo Q1 y Q3 una resolución de 0,7 Da FWHM, con un ancho de escaneo de 0,010 Da y un tiempo de exploración de 0,040 segundos. Siguiendo el mismo procedimiento se han inyectado los patrones de ácido carnósico y carnosol a distintas concentraciones para poder calcular su contenido en las muestras, determinándose las fracciones biodisponible y bioaccesible.

2.7.3 Medida de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible

La determinación de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero B y de una mezcla de patrones, entendiéndose como tal los compuestos mayoritarios presentes en este extracto a la misma concentración, se ha llevado a cabo en el modelo de inflamación de macrófagos activados con LPS, según se ha descrito anteriormente.

Tras los periodos de incubación empleados durante el estudio de la absorción intestinal *in vitro* (2, 4, 8 y 12 horas), el medio de cultivo recogido de la zona basolateral de los pocillos de las placas Transwell® se ha liofilizado siguiendo un procedimiento análogo al utilizado durante la determinación de la concentración de ácido carnósico y carnosol. Posteriormente, se ha adicionado 1 mL del medio de cultivo empleado para el crecimiento de los macrófagos, con el propósito de disolver la fracción biodisponible.

En este caso, los macrófagos se han activado incorporando 0,05 µg/mL de LPS al mismo tiempo que las fracciones biodisponibles, siendo un procedimiento análogo al descrito en la determinación de la actividad antiinflamatoria; el tratamiento se ha incubado durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂ y una vez transcurrido este tiempo se ha recogido el medio de cultivo para determinar la secreción de citoquinas. En este ensayo se ha evaluado la secreción de las citoquinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 mediante el ensayo ELISA, empleando el procedimiento descrito con anterioridad.

2.8 Formulación del extracto supercrítico de romero para su incorporación a alimentos de uso específico para la salud con propiedades antiinflamatorias

2.8.1 Incorporación del extracto de romero a una matriz alimentaria de origen lácteo

El extracto supercrítico de romero, obtenido con un 5% de etanol como co-solvente, se ha incorporado a una matriz alimentaria de origen lácteo, micelas de caseínas disueltas en permeado de leche, obtenido por ultrafiltración. Tanto las micelas de caseínas como el permeado, se han obtenido a partir de leche fresca desnatada procedente de un supermercado local. Inicialmente se ha obtenido el permeado mediante un proceso de ultrafiltración en un equipo a escala de laboratorio, empleándose un cartucho de 10000 Da con un área de 0,095 m² (Millipore CDUF001LG; Fisher Scientific, Ottawa, Canadá). Posteriormente, se ha llevado a cabo la separación de las caseínas mediante centrifugación a 36000 g, durante 45 minutos, a una temperatura de 20 °C (Beckman Coulter Inc., Mississauga, Canada) (del Angel y Dalglish, 2006). Una vez finalizada la centrifugación se ha descartado el sobrenadante, formado por las proteínas solubles en el suero, y se ha incorporado el permeado hasta igualar el peso de la leche de partida, mezclándolo en un homogeneizador (Ultra-Turrax, IKA T18, Wilmington, EEUU). Finalmente se ha incorporado el extracto de romero disuelto en etanol hasta una concentración final de 2 mg/mL, no superándose el 2 % de etanol, y agitándolo a continuación con la ayuda de un mezclador, durante 2 minutos.

Con el propósito de comparar los resultados de la incorporación del extracto de romero en las micelas de caseínas con una emulsión común, se ha preparado una emulsión del extracto con aceite de soja y Tween 20. Para ello se ha disuelto el extracto de romero en aceite de soja y se ha incorporado la mezcla en un 10% a una solución de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá) al 2,2% en agua. La solución se ha mezclado inicialmente en un homogeneizador durante 2 minutos y a continuación se ha pasado la muestra 4 veces por un microfluidificador (M-110EH Microfluidizer Processor, Microfluidics, MA, EEUU) a una presión de 350 kPa. Posteriormente, se ha determinado el tamaño de partícula de las micelas formadas en un equipo de difracción láser (Mastersizer

S, Malvern Southborough, MA, EEUU). La distribución del tamaño de las micelas se ha medido empleando 1,47 de índice de refracción para el aceite de soja y 1,33 para el agua.

2.8.2 Biodisponibilidad *in vitro*

Los estudios de biodisponibilidad *in vitro* se han llevado a cabo con el propósito de simular los procesos de digestión y absorción intestinal que tienen lugar *in vivo*, y han constado de las siguientes etapas: inicialmente una digestión *in vitro*, seguida de una absorción intestinal *in vitro* y por último, una determinación de la cantidad de ácido carnósico y carnosol tras cada etapa del proceso de digestión y absorción, para calcular las fracciones biodisponible y bioaccesible del extracto de romero B según la matriz.

2.8.2.1 Digestión *in vitro*

Para llevar a cabo los estudios de biodisponibilidad *in vitro* del extracto de romero, se ha comenzado con una etapa de digestión *in vitro*, como muestras se han empleado el extracto de romero incorporado en las micelas de caseína, la emulsión del extracto con Tween 20, obtenidas según se ha descrito anteriormente, y por último el extracto de romero directamente disuelto en una solución de agua y etanol (figura 21). Las tres muestras empleadas en la digestión *in vitro* presentan una concentración de extracto de romero de 2 mg/mL.

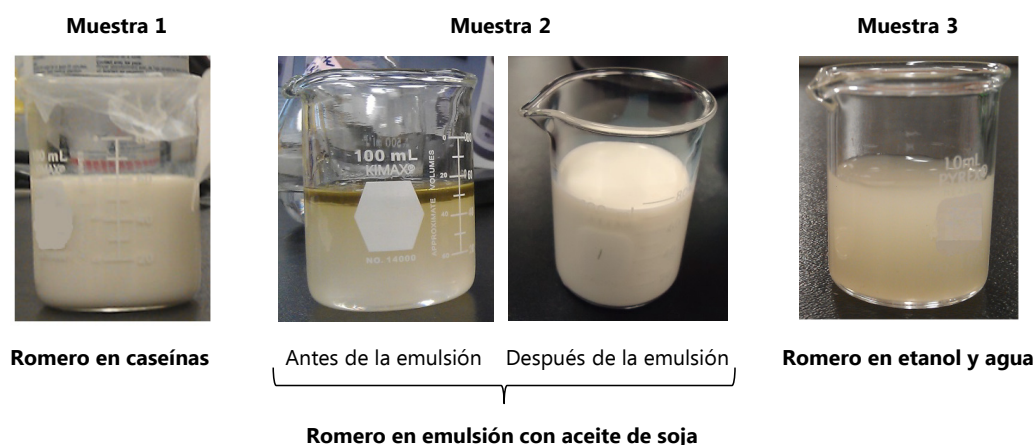


Figura 21: Muestras empleadas en la digestión *in vitro*

El proceso de digestión *in vitro* se ha realizado en dos etapas: gástrica y duodenal. El método que se ha seguido ha tenido como base el publicado por Versantvoort y col. (2005) con varias modificaciones. La composición de los jugos digestivos empleados se detalla en la tabla 5, completándose hasta 500 mL con agua destilada el volumen de las disoluciones orgánica e inorgánica de cada uno de los jugos. Previamente a su uso se han atemperado todas las disoluciones a 37 °C y se ha ajustado el pH hasta alcanzar el valor indicado. En frascos de cristal topacio se han adicionado 6 mL de cada una de las tres muestras a digerir, es decir del extracto incorporado en las caseínas, de la emulsión en Tween 20 y del extracto directamente disuelto en etanol y agua. Posteriormente, en la etapa gástrica, se han añadido 12 mL de los jugos gástricos y se ha incubado la mezcla en agitación, 200 rpm, en un baño con control de temperatura (New Brunswick Scientific Co., Inc., NJ, EEUU), durante 1 hora a 37 °C. Pasada la etapa de digestión gástrica, se han añadido 12 mL de los jugos de la etapa del duodeno, 6 mL de sales biliares y 2 mL de bicarbonato (1M) (Sigma-Aldrich, Oakville, Canadá), incubándose la mezcla durante 2 horas en agitación, 200 rpm y 37 °C. Transcurrido este tiempo, se han guardado las muestras hasta su posterior uso a - 20 °C.

Tabla 5: Contenido de los jugos digestivos preparados para la digestión *in vitro*.

	Etapa gástrica	Etapa duodenal	Sales biliares
Disolución inorgánica	15,7 mL NaCl 175,3 g/L 3,0 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/L 9,2 mL KCl 89,6 g/L 18mL CaCl ₂ · 2H ₂ O 22,22 g/L 10 mL NH ₄ Cl 30,6 g/L 6,5 mL HCl 37% g/g	40 mL NaCl 175,3 g/L 40 mL NaHCO ₃ 84,7 g/L 10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g/L 6,3 mL KCl 89,6 g/L 10 mL MgCl ₂ 5g/L 180 µL HCl 37% g/g	30 mL NaCl 175,3 g/L 68,3 mL NaHCO ₃ 84,7 g/L 4,2 mL KCl 89,6 g/L 150 µL HCL 37% g/g
Disolución orgánica	10 mL glucosa 65 g/L 10 mL ácido glucurónico 2 g/L 3,4 mL urea 25 g/L 10 ml clorhidrato de glucosamina 33 g/L	4 mL urea 25 g/L	10 mL urea 25 g/L
Incorporar al mezclar las soluciones orgánica e inorgánica	1g BSA 2,5 g pepsina	9 mL CaCl ₂ · 2H ₂ O 22,2 g/L 1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipasa	10 mL CaCl ₂ · 2H ₂ O 22,2 g/L 1,8 g BSA 30 g bilis
pH	1,3 ±0,02	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

2.8.2.2 Absorción intestinal *in vitro*

El estudio de la absorción intestinal de las muestras obtenidas tras la etapa de digestión *in vitro* se ha realizado utilizando células Caco-2. El procedimiento de crecimiento y diferenciación de las células a enterocitos ha sido análogo al descrito previamente.

Tras comprobar la integridad de la monocapa de enterocitos diferenciados, se han incorporado 29,4 μ L de las muestras digeridas y medio de cultivo hasta 500 μ L de volumen final (dilución 1:16) en la zona apical de las placas, habiéndose comprobado previamente que no afectaba a la viabilidad de las células. Las placas se han incubado durante 2 y 4 horas a 37 °C y un 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de ensayo, se ha recogido el medio de cultivo de las zonas apical y basolateral de los pocillos y se ha almacenado a -20 °C hasta su uso posterior. Asimismo, se han recogido las células de las membranas de los pocillos con PBS y se han guardado a -20 °C.

2.8.2.3 Determinación de la cantidad de ácido carnósico y carnosol de los productos obtenidos tras cada etapa del proceso de digestión y absorción.

Con el propósito de estudiar la cantidad de ácido carnósico y carnosol que permanece tras cada etapa del proceso de digestión y absorción, se ha llevado a cabo un análisis de las muestras empleando la técnica UHPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS).

Tras la etapa de digestión *in vitro*, se han tomado muestras de las tres digestiones realizadas (romero incorporado en caseínas, romero directamente y romero en la emulsión) y se han liofilizado. Una vez liofilizadas las muestras, se han añadido 400 μ L de etanol, mezclándose a continuación empleando un baño de ultrasonidos. Posteriormente, se han centrifugado las muestras a 5000 rpm para eliminar los sólidos en suspensión y se ha recogido el etanol del sobrenadante.

Una vez finalizada la etapa de absorción, en el caso de las muestras obtenidas a partir del medio de cultivo de las zonas apical y basolateral, se ha seguido un procedimiento análogo al ya descrito, con una etapa de liofilización y una extracción con etanol. Finalmente, para las muestras de las células recogidas con PBS de las membranas

de los pocillos, se han realizado dos pasos de extracción con acetona y una disolución final en etanol, como se ha descrito con anterioridad.

Una vez obtenidas todas las muestras, su análisis se ha realizado utilizando un equipo de UHPLC, mediante el método descrito anteriormente.

2.9 Tratamiento estadístico

Los datos se han expresado como el valor de la media \pm desviación estándar. Para comparaciones múltiples de datos se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y el post-test Dunnett. La realización de los cálculos se ha llevado a cabo usando el programa informático *SigmaStat Statistical* (Windows Version 5.0 Systat Software Inc., Point Richmond, CA, EEUU). Aquellos valores de p mayores de 0,05 se han considerado significativos.

3



3.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos supercríticos procedentes de distintas plantas aromáticas

En este apartado se ha llevado a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos por tecnología de fluidos supercríticos a partir de plantas aromáticas pertenecientes a la familia de las labiadas: orégano, tomillo, salvia, albahaca, mejorana y romero. El empleo de un fluido en estado supercrítico, en este caso el CO₂, en el proceso de extracción, aporta una serie de ventajas frente a las técnicas tradicionales (hidrodestilación, extracción por arrastre con vapor o extracción con disolventes orgánicos), ya que es una técnica selectiva, limpia, rápida, segura y en la que se emplea una nula o mínima cantidad de disolventes, quedando patente el interés que existe en la industria alimentaria por el empleo de este procedimiento de extracción en la obtención de ingredientes funcionales. El procedimiento de extracción se ha llevado a cabo empleando un flujo de CO₂ de 60 g/min, una temperatura de 40 °C y una presión de 30 MPa, durante un tiempo de extracción de 6 horas. La selección de estos parámetros de extracción se ha realizado en base a los resultados obtenidos por miembros del Grupo de Investigación en experimentos previos (García-Risco y col., 2011a; García-Risco y col., 2011b; Fornari y col., 2012a).

Esta evaluación incluye la medida de la actividad antiinflamatoria de los distintos extractos supercríticos, la relación de la composición química de los extractos con el efecto antiinflamatorio encontrado y, finalmente, el estudio de la influencia del tiempo de tratamiento en dicha actividad.

3.1.1 Medida de la actividad antiinflamatoria de los distintos extractos supercríticos

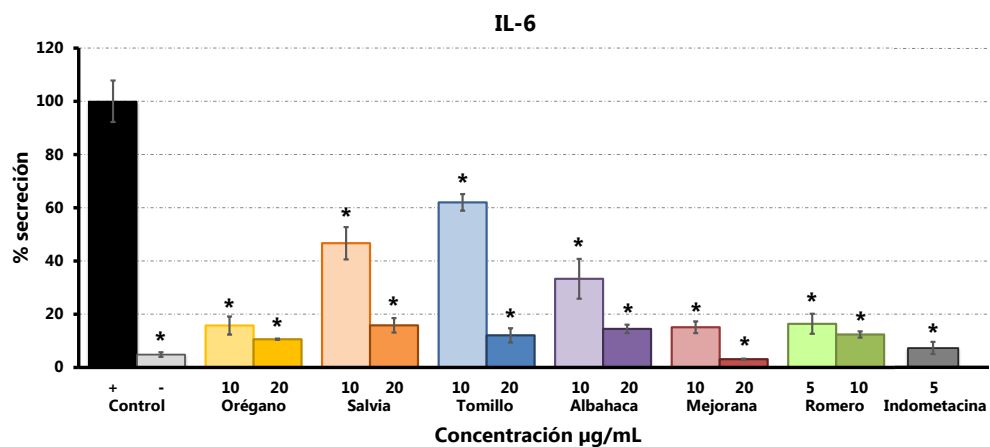
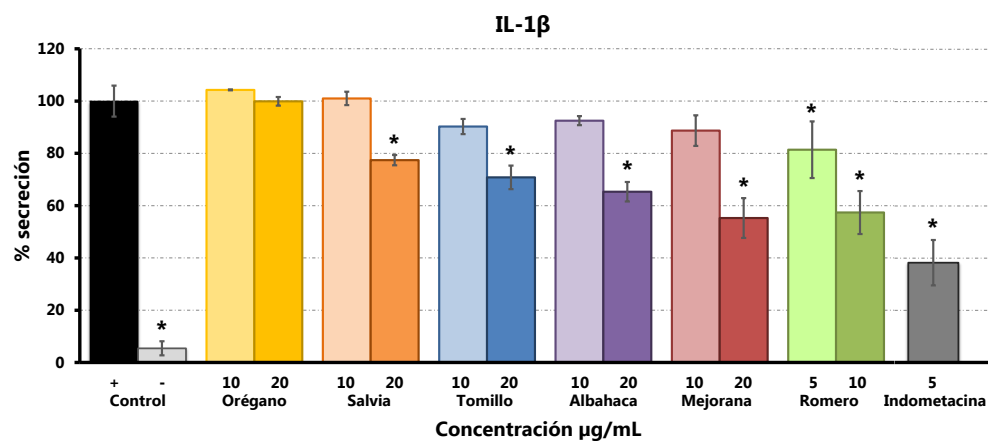
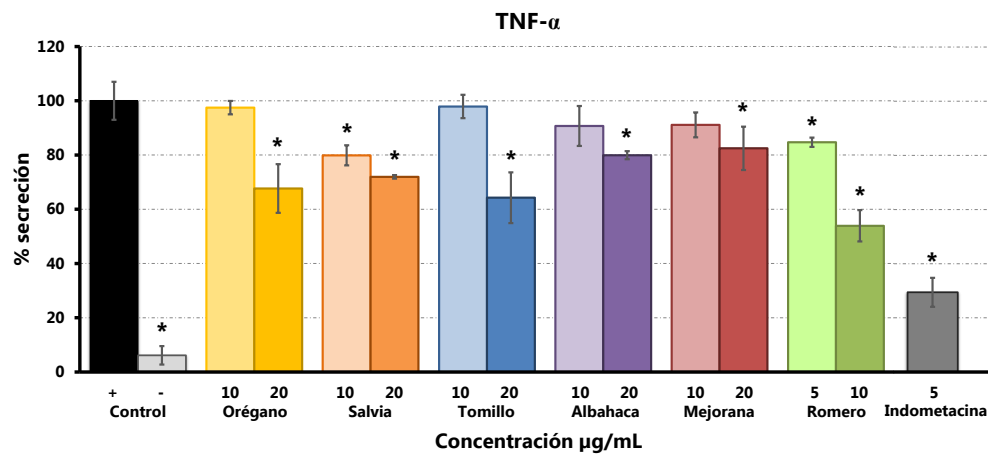
La medida de la actividad antiinflamatoria de los extractos supercríticos de las distintas plantas se ha realizado *in vitro* mediante la utilización de macrófagos humanos de la línea celular THP-1. Por un lado, se ha utilizado un modelo de inflamación en el que se incorpora al medio de cultivo de los macrófagos lipopolisacárido bacteriano (LPS) y, por otro, un modelo mediado por un proceso de oxidación, donde se adiciona en el medio de cultivo lipoproteínas de baja densidad de origen humano oxidadas (LDLox). Además, con el propósito de comparar la actividad antiinflamatoria de los extractos supercríticos con un

fármaco antiinflamatorio de uso habitual, también se ha estudiado la actividad antiinflamatoria de la indometacina.

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se han empleado dos técnicas, la medida de la secreción al medio de cultivo de los macrófagos de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la antiinflamatoria IL-10 y, por otro lado, el estudio de su expresión génica. La medida de la secreción de citoquinas se ha realizado empleando la técnica de ELISA tipo sándwich, mientras que la determinación de la expresión génica, con una cuantificación relativa, ha requerido la técnica de PCR a tiempo real.

3.1.1.1 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS

Las concentraciones de los extractos supercríticos añadidos a los macrófagos son de 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ para todas las plantas, siendo 20 $\mu\text{g/mL}$ la máxima concentración que no presentaba citotoxicidad (datos no mostrados), salvo en el caso del romero donde la máxima concentración sin citotoxicidad era de 10 $\mu\text{g/mL}$ y, por ello, se ensayaron las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la indometacina se ha empleado una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, no tóxica para las células. La duración del tratamiento en todos los casos ha sido de 24 horas. En todos los ensayos se ha incluido un control positivo, con macrófagos estimulados con LPS en ausencia de los extractos de plantas y un control negativo donde las células no se han estimulado con LPS y que representa el estado basal. La adición de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de LPS al medio de cultivo de los macrófagos ha dado lugar a un incremento en la secreción de todas las citoquinas ensayadas (figura 22), con respecto a la situación basal del control negativo. Por su parte, concentraciones de 20 $\mu\text{g/mL}$ de los distintos extractos provocaron en todos los casos, una disminución de la secreción de TNF- α , mientras que con 10 $\mu\text{g/mL}$ la disminución fue mucho menos intensa. De las seis plantas utilizadas, el romero redujo de forma importante la secreción de TNF- α , ya que 10 $\mu\text{g/mL}$ del extracto supercrítico disminuyeron en más de un 40% la secreción de esta citoquina.



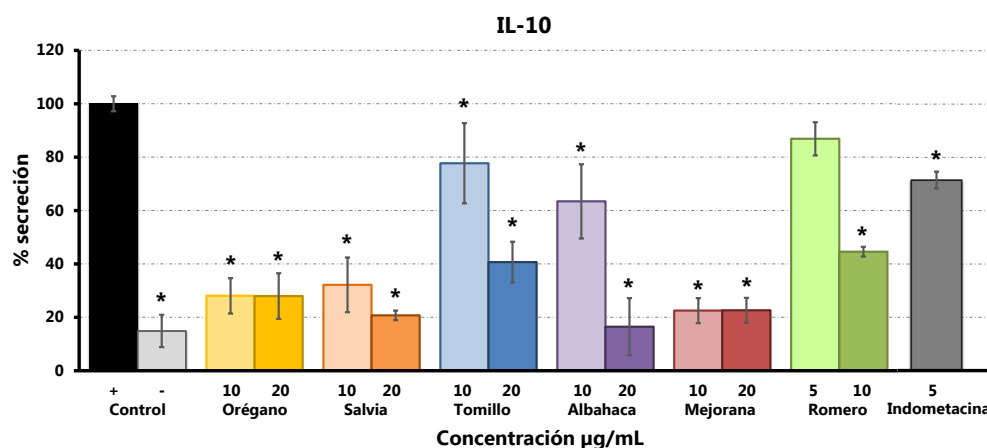


Figura 22: Secreción de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ e $IL-10$ en macrófagos activados con LPS en presencia de extractos supercríticos de plantas tras 24 horas de tratamiento. * $p < 0,05$ con respecto al control +.

De igual modo, en el caso de la secreción de $IL-1\beta$, se observa que, en la mayoría de los casos, 20 µg/mL de los extractos disminuyen su secreción al medio. Cuando se comparan los distintos extractos, el romero también es la planta que ha reducido más la secreción. La liberación de $IL-6$, tras el tratamiento con los extractos supercríticos, se ha reducido de forma muy acusada. Con la máxima concentración utilizada, la secreción ha disminuido en todos los casos hasta niveles similares a los del control negativo.

Por último, la liberación de $IL-10$, citoquina antiinflamatoria, también ha aumentado tras adicionar LPS, siendo este incremento de alrededor de un 85%, en un intento por parte de las células de paliar el estado inflamatorio del medio. En todos los casos, la secreción de $IL-10$, tras la adición de los extractos, ha presentado unos niveles menores a los del control positivo; pudiendo interpretarse, que su liberación no es tan necesaria, al encontrarse las células en un menor estado inflamatorio, directamente relacionado con el descenso en la liberación de citoquinas proinflamatorias asociado a la presencia de los distintos extractos.

La indometacina ha reducido la secreción de todas las citoquinas medidas en el ensayo. El fármaco se ha incorporado al estudio como un control para demostrar su actividad antiinflamatoria en el modelo propuesto y poder comparar su actividad con la de los extractos supercríticos.

Posteriormente se ha determinado la expresión génica en las mismas células en las que se midió la liberación de citoquinas, seleccionando la concentración de 20 µg/mL para todos los extractos, salvo el de romero (10 µg/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 23, donde se representa el valor RQ, es decir, la expresión génica relativa, caracterizado por ser directamente proporcional a la expresión del gen que se estudie. El valor 1 de RQ se ha otorgado a la expresión génica de la situación basal, comparándose así el resto de muestras con el control negativo (células sin estimular).

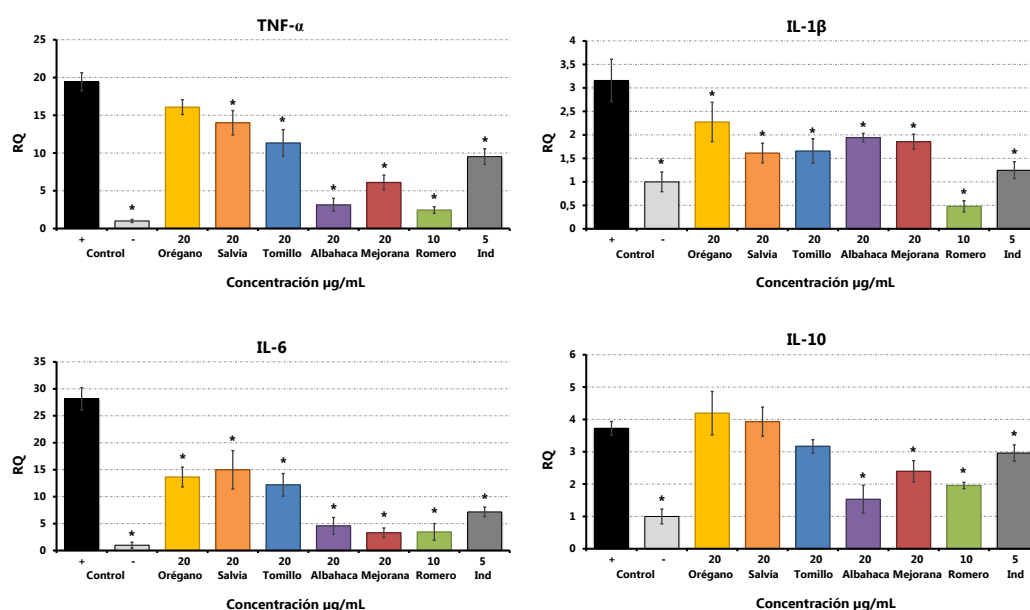


Figura 23: Expresión génica de *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* e *IL-10* en macrófagos activados con LPS tras 24 horas de tratamiento. Ind: indometacina. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Al igual que ha ocurrido con la liberación de citoquinas al medio, por parte de los macrófagos, la activación con LPS ha dado lugar a un incremento en la expresión génica de todas las citoquinas estudiadas, en coincidencia con los datos publicados por otros autores que han descrito que la adición de LPS a macrófagos de la línea celular THP-1 produce un incremento tanto de la secreción como de la expresión de citoquinas proinflamatorias entre las que se sitúan *TNF-α*, *IL-1β* o *IL-6*, como antiinflamatorias, entre ellas *IL-10* (Kim y col., 2010; Saraiva y O'Garra, 2010; Wasaporn y col., 2010; Smiderle y col., 2011).

La incorporación de los extractos supercríticos de las diversas plantas ha ocasionado la inhibición de la expresión de las citoquinas proinflamatorias en todos los casos. Hay que destacar que los extractos de albahaca, mejorana y romero han inhibido la expresión de TNF- α e IL-6 hasta casi regresar a la situación basal. La expresión génica de IL-1 β también ha disminuido tras el tratamiento con estos extractos, aunque sólo se ha reducido hasta el nivel basal para el extracto de romero. En el caso de IL-10 los extractos de orégano, salvia y tomillo no modificaron significativamente la secreción, mientras que las otras tres plantas la disminuyeron. De todos los extractos estudiados, el romero, seguido de la albahaca y la mejorana, ha presentado una mayor disminución de la expresión génica de las tres citoquinas proinflamatorias. En el caso de la indometacina, su adición ha producido también una disminución en la expresión génica de todas las citoquinas estudiadas.

Si se comparan estos resultados de expresión génica con los obtenidos en la secreción de citoquinas, se puede indicar que existe una cierta correlación. Sin embargo, en el caso del extracto supercrítico del romero la inhibición en la expresión génica de las citoquinas es mucho más acusada que la observada en su secreción, llegando la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias a disminuir hasta valores basales tras las 24 horas de tratamiento. Destaca, asimismo, la mayor actividad de la albahaca, que teniendo unos valores de secreción similares a los de otras plantas como el orégano y el tomillo, provocó un descenso en la expresión génica similar a la del romero, salvo para IL-1 β .

La incorporación de los extractos supercríticos de las plantas ha provocado, en la mayoría de los casos, una reducción de la secreción de todas las citoquinas estudiadas, demostrándose su capacidad antiinflamatoria al paliar el estado inflamatorio provocado por la adición de LPS en el medio de cultivo. Estos resultados están apoyados por los obtenidos por otros autores. Kuo y col (2011), empleando un extracto supercrítico de romero, encontraron que la incorporación de 12,5 ó 25 $\mu\text{g/mL}$ en un modelo celular de inflamación con macrófagos de ratón activados por LPS, reducía la secreción de TNF- α en más de un 20%. Del mismo modo, Yu y col. (2013) han publicado recientemente que la actividad antiinflamatoria, en macrófagos de ratón activados con LPS, de un extracto de *Rosmarinus officinalis* obtenido empleando una extracción con metanol y posterior fraccionamiento con hexano, era capaz de reducir la secreción de TNF- α y PGE₂. También, empleando el mismo modelo de inflamación *in vitro*, Mueller y col. (2010) demostraron la actividad antiinflamatoria de diversas especies de plantas aromáticas, determinando la

secreción de $\text{TNF-}\alpha$, IL6 e IL-10 y la expresión génica de las enzimas COX-2 e iNOS. Concretamente estos autores encontraron que 200 $\mu\text{g/mL}$ de extractos sólido-líquido procedentes de orégano, salvia, albahaca, mejorana y romero reducían la secreción de IL-6 tras un periodo de incubación de 24 horas. Para $\text{TNF-}\alpha$ obtuvieron una reducción de la secreción tras la incorporación de salvia, orégano y tomillo, no modificándose con romero, mejorana y albahaca. Finalmente, para la secreción de IL-10, observaron una importante reducción tras la incorporación de romero, salvia y tomillo, resultados que están en concordancia con los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, se ha demostrado que extractos de *Thymus vulgaris* son capaces de reducir la expresión génica de iNOS y, por tanto, la liberación de NO, mostrando actividad antiinflamatoria (Vigo y col., 2004).

Además, extractos obtenidos a partir de otras especies afines a las estudiadas, como *Salvia miltiorrhiza*, también han presentado una inhibición, en un modelo celular de inflamación con macrófagos de ratón activados por LPS, tanto de la secreción como la expresión génica de $\text{TNF-}\alpha$ (Wan y col., 2006). Asimismo, se ha descrito un efecto antiinflamatorio para la especie *Salvia plebeia*, donde extractos etanólicos disminuyen la liberación del NO (Jung y col., 2009). El aceite esencial de *Origanum ehrenbergii* y *Origanum syriacum*, en el mismo modelo de inflamación con macrófagos de ratón activados por LPS, también ha ejercido un efecto antiinflamatorio al reducir la liberación de NO (Loizzo y col., 2009).

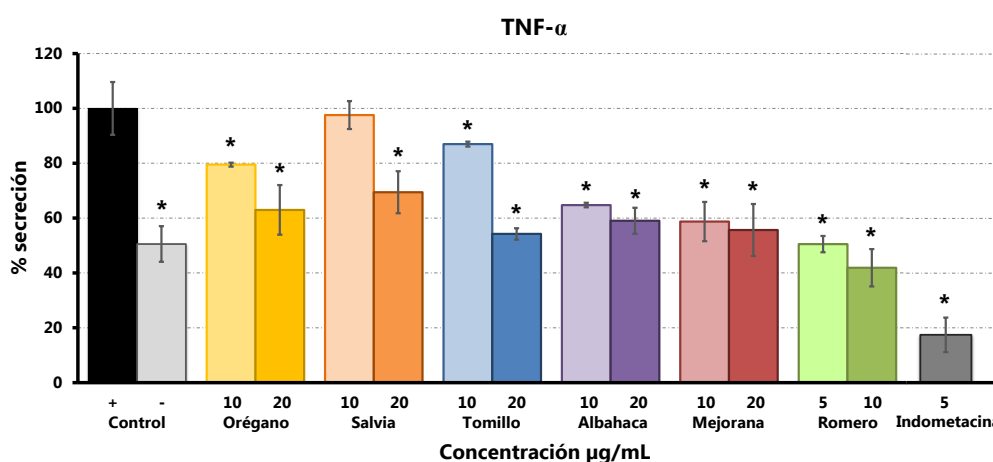
Hay que destacar que las concentraciones de los extractos supercríticos empleadas en este trabajo experimental son, en general, mucho menores que las encontradas en la bibliografía. En este sentido, destaca el extracto de romero que en concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ es capaz de producir una disminución muy acusada de las distintas citoquinas proinflamatorias, mientras otros autores para conseguir resultados similares en un modelo de inflamación con células RAW 264.7, necesitan 25 $\mu\text{g/mL}$ de un extracto supercrítico de romero (Kuo y col., 2011).

Se puede concluir que los extractos supercríticos de todas las plantas utilizadas muestran una importante actividad antiinflamatoria en el modelo empleado, que se pone de manifiesto con una disminución importante tanto de la liberación de las citoquinas proinflamatorias estudiadas, como de la expresión génica de las mismas, destacando el extracto de romero, seguido del de la mejorana.

3.1.1.2 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox

Los resultados obtenidos en este apartado aparecen reflejados en la figura 24. Tras la estimulación de los macrófagos durante 24 horas con 75 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox se ha producido un incremento en la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ de aproximadamente un 50% comparado con la situación basal. Cuando los macrófagos estimulados se mantuvieron en contacto con 20 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos supercríticos de las plantas estudiadas, se ha producido una disminución significativa en la secreción de esta citoquina, regresando, en algunos casos, incluso a los niveles basales. De los seis extractos estudiados, los que han presentado un mayor descenso en la secreción han sido los obtenidos a partir de albahaca, mejorana y romero. De este modo, 5 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de romero ocasionan un descenso de la liberación de $\text{TNF-}\alpha$ hasta los niveles registrados por el control negativo. En el caso de la utilización de 10 $\mu\text{g/mL}$ de albahaca y mejorana esta disminución también se aproxima a los niveles basales.

En el caso de $\text{IL-1}\beta$, al igual que ocurre con $\text{TNF-}\alpha$, la adición de LDLox ha incrementado la secreción de esta citoquina. De los seis extractos estudiados, aunque todos presentan una disminución en la secreción, el mayor efecto se ha encontrado con la adición de 10 $\mu\text{g/mL}$ de albahaca, mejorana y romero.



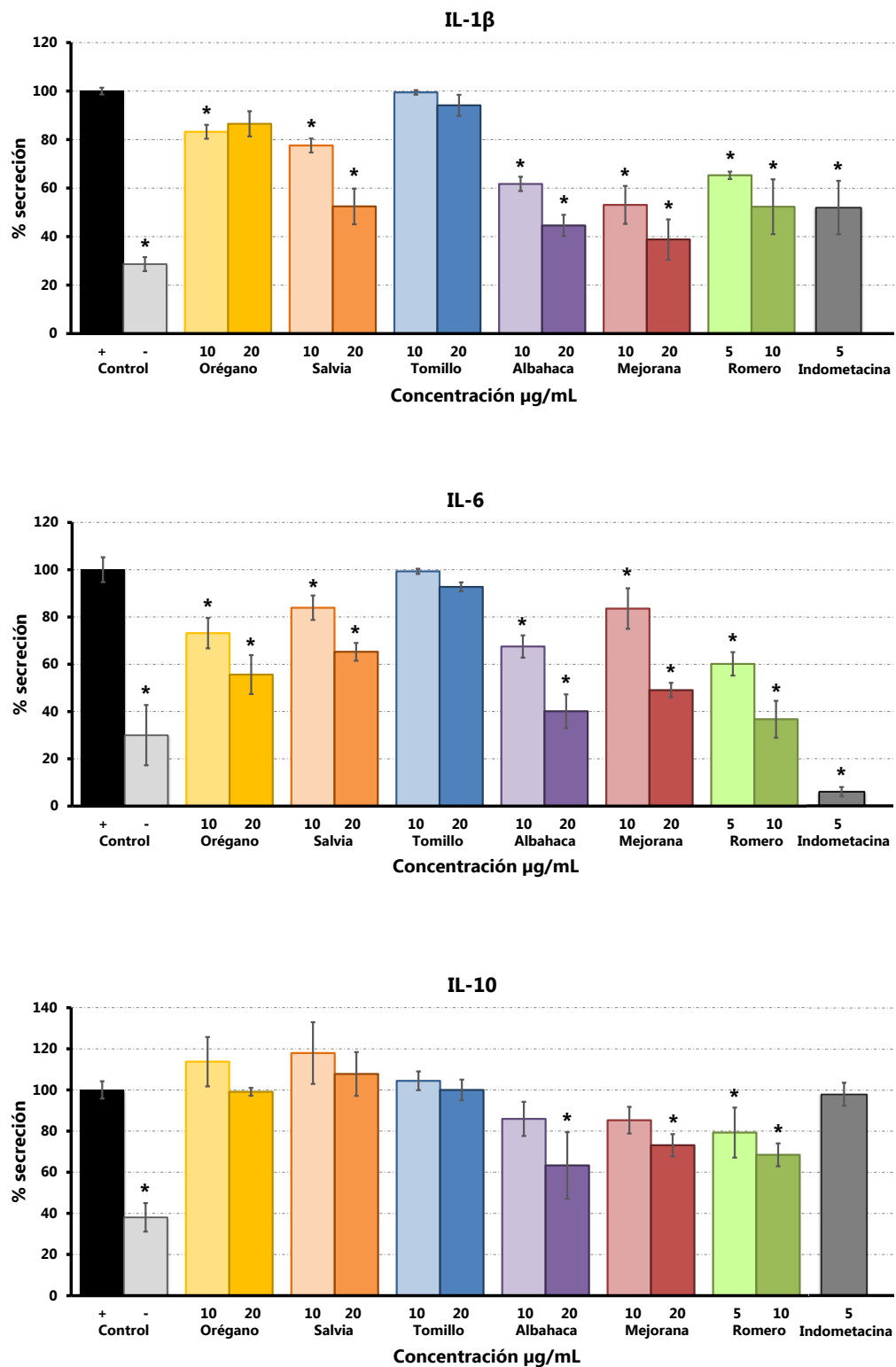


Figura 24: Secreción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 en macrófagos activados con LDLox en presencia de extractos supercríticos de plantas tras 24 horas de tratamiento. * $p < 0,05$ con respecto al control +.

La liberación de IL-6 al medio de cultivo también ha aumentado con la adición de LDLox, siendo el incremento de alrededor de un 70%. De todas las plantas utilizadas, se puede destacar la mayor inhibición en la secreción presentada por los extractos supercríticos de albahaca y romero, mientras que el extracto de tomillo no ha modificado significativamente la secreción de IL-6.

En cuanto a la última citoquina ensayada, IL-10, la inducción del proceso inflamatorio ha incrementado su secreción, variando el comportamiento de las células según la planta utilizada. Los extractos de orégano, salvia y tomillo no han modificado la secreción, mientras que los de albahaca, mejorana y romero la han reducido.

En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos para la expresión génica en el modelo de inflamación dependiente de oxidación. De su interpretación se puede inferir que la adición al medio de cultivo de LDLox ha provocado un incremento en la expresión génica de todos los genes estudiados, resultado que corrobora lo obtenido en los experimentos de secreción. La incorporación de los extractos de las plantas tras la inducción del proceso inflamatorio ha reducido, en la mayoría de los casos, la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, llegando hasta los niveles basales del control negativo en el caso de la expresión de IL-6, para todos los extractos ensayados. Por otro lado, ninguno de los extractos ha modificado significativamente tras 24 horas de ensayo, la expresión génica de IL-10.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica, han corroborado los descritos para la liberación de citoquinas. En este sentido, es interesante destacar que el extracto supercrítico de romero muestra en ambos casos la mayor actividad antiinflamatoria, seguido de los extractos de albahaca y mejorana.

La inducción del proceso inflamatorio mediante la incorporación en el medio de cultivo de LDLox ha incrementado la secreción y la expresión de todas las citoquinas medidas, resultado similar al obtenido con la incorporación de LPS, aunque las diferencias entre la situación basal y la patológica han sido menores en el primer caso. Esta inducción del estado inflamatorio mediante la adición de LDLox también ha sido descrita por otros autores; en este sentido, Kaperonis y col (2006) demostraron la existencia de un incremento tanto en la secreción como en la expresión génica de TNF- α , IL-1 β o IL-6 tras la incorporación de LDLox.

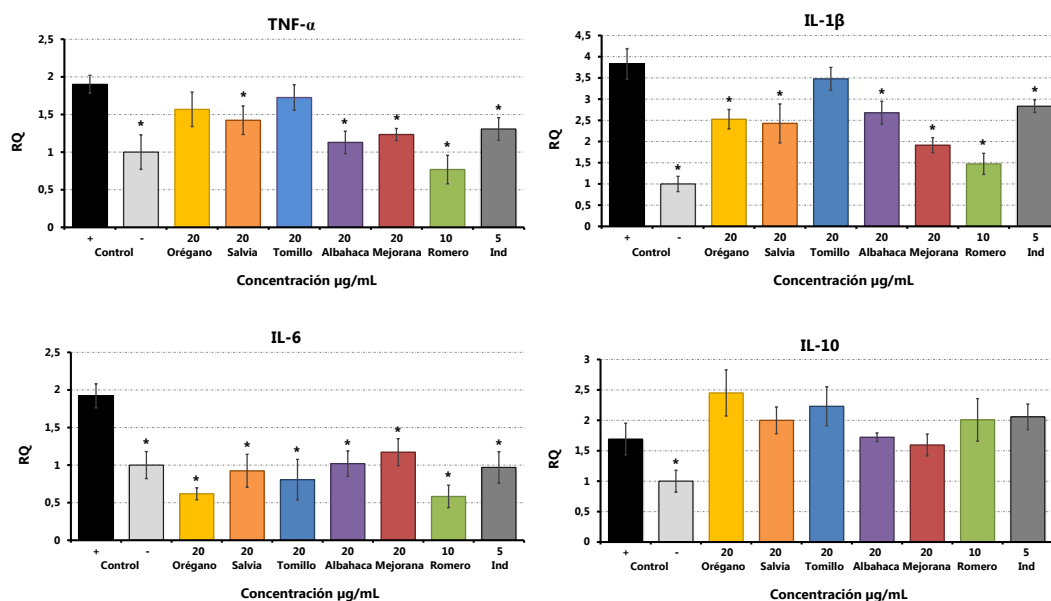


Figura 25: Expresión génica de *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* e *IL-10* en macrófagos activados con LDLox en presencia de los extractos supercríticos, tras 24 horas de tratamiento. Ind: indometacina. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Son escasos los estudios publicados en los que se determina la actividad antiinflamatoria de un extracto o un compuesto de origen vegetal empleando el modelo de inflamación dependiente de oxidación que se ha desarrollado a lo largo del presente apartado. Sin embargo, Choi y col (2007) evaluaron la actividad antiinflamatoria del pinitol procedente de la soja, con este mismo modelo de inflamación, observando una reducción de la secreción y expresión génica de *TNF-α* e *IL-1β*. En este sentido, Liu y col. (2009), demostraron la actividad antiinflamatoria de un extracto de *Ginkgo biloba* en un modelo de células THP-1 activadas con LDLox, ya que la incorporación del extracto en el medio de cultivo de las células reducía la expresión génica del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Empleando también este modelo de inflamación *in vitro*, Chu y col. (2009) estudiaron la actividad antiinflamatoria en un extracto de *Zanthoxylum ailanthoides*, capaz de reducir la acumulación de lípidos en los macrófagos. Asimismo, la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas, con 50 $\mu\text{g/mL}$ de LDLox, en presencia de quercitina, produjo una disminución en la secreción de *IL-6*, debido al efecto modulador que ejerce en NF κ B (Bhaskar y col., 2011).

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los extractos supercríticos ensayados en los dos modelos de inflamación, tras las 24 horas de tratamiento, se observa

que los extractos han ejercido un mayor efecto antiinflamatorio, reduciendo la secreción y la expresión génica de citoquinas proinflamatorias, en el modelo de inflamación mediado por un proceso de oxidación. De las seis plantas ensayadas con este modelo, el romero ha presentado la mayor actividad, puesto que concentraciones inferiores al resto de las plantas (5 µg/mL), provocan una reducción en la secreción de citoquinas proinflamatorias comparable o incluso superior a otras plantas con concentraciones más elevadas. Si se comparan los resultados obtenidos al añadir 10 µg/mL de los extractos, también la albahaca y la mejorana presentan una actividad antiinflamatoria superior al resto de plantas. Por tanto, se puede afirmar que en el modelo dependiente de oxidación, las plantas más activas han sido la albahaca, la mejorana y el romero.

En este sentido, hay que tener en cuenta que existen en la bibliografía varios artículos que relacionan la actividad antioxidante de un extracto o compuesto y su actividad antiinflamatoria. Según han descrito Chohan y col (2012), el mayor valor de TEAC de la salvia, el romero y el tomillo está correlacionado con su mayor capacidad antiinflamatoria, determinada por un descenso en la secreción de IL-8, citoquina proinflamatoria. Zhang y col. (2011), también han demostrado una correlación positiva entre la cantidad de polifenoles, la actividad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de 14 plantas medicinales de origen chino, determinando la secreción de TNF- α y la producción de NO en macrófagos murinos.

Atendiendo a los resultados anteriores, en este trabajo se ha determinado la actividad antioxidante de todos los extractos utilizados, mediante el método del radical ABTS, expresándose los resultados como valor TEAC (mmol trolox/g de extracto). De los resultados obtenidos (tabla 6), puede observarse que el extracto de romero presenta la mayor capacidad antioxidante, dato que podría explicar su mayor actividad antiinflamatoria en el modelo dependiente de oxidación. Del resto de plantas estudiadas, el extracto supercrítico de albahaca presenta una buena actividad antioxidante, dato que también está en concordancia con su mayor actividad antiinflamatoria en el modelo propuesto. Sin embargo, los extractos de mejorana, salvia y orégano, han mostrado una actividad antioxidante muy parecida, mientras que, la actividad antiinflamatoria es superior en el primer extracto. Parece por tanto, que una actividad antioxidante alta puede correlacionarse con su capacidad antiinflamatoria en el modelo de inflamación mediado por oxidación, mientras que con valores bajos de actividad antioxidante, tal es el caso de la mejorana, la salvia y el orégano, no se puede establecer esa correlación directa.

Tabla 6: Medida de la actividad antioxidante de los extractos supercríticos.

Extracto	mmol trolox/g extracto
Orégano	0,084±0,010
Salvia	0,089±0,000
Tomillo	0,051±0,002
Albahaca	0,250±0,018
Mejorana	0,085±0,011
Romero	0,932±0,040

3.1.2 Relación de la composición química de los extractos supercríticos con su actividad antiinflamatoria.

Con el fin de poder conocer, en la medida de lo posible, cuáles son los componentes asociados a las actividades biológicas encontradas, se llevó a cabo un estudio de la actividad de patrones puros, escogiendo aquellas sustancias que se describen en la bibliografía como componentes habituales de las plantas estudiadas. Los compuestos seleccionados son, en un caso, integrantes de los aceites esenciales (alcanfor, 1,8-cineol, sabineno, α -terpineol, eugenol y cinamato de metilo) y en otro diterpenos fenólicos presentes en las oleorresinas (ácido carnósico y carnosol) (Proestos y col., 2005; Shan y col., 2005; Proestos y col., 2006).

Este ensayo se ha llevado a cabo mediante la estimulación de los macrófagos con LDLox, dado que los extractos supercríticos sometidos a este modelo presentaron las actividades más elevadas.

Previo a la determinación de las actividades antiinflamatorias, se ha evaluado la toxicidad de los productos ensayados, estableciéndose para la mayoría de los casos como concentración máxima no tóxica la de 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Por tanto, se han considerado concentraciones de 5 y 7,5 $\mu\text{g/mL}$, salvo en el caso del carnosol y del ácido carnósico, en los que se establece 5 $\mu\text{g/mL}$ como máxima concentración no tóxica, utilizándose concentraciones de 2 y 5 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados referentes a liberación de citoquinas se presentan en la figura 26.

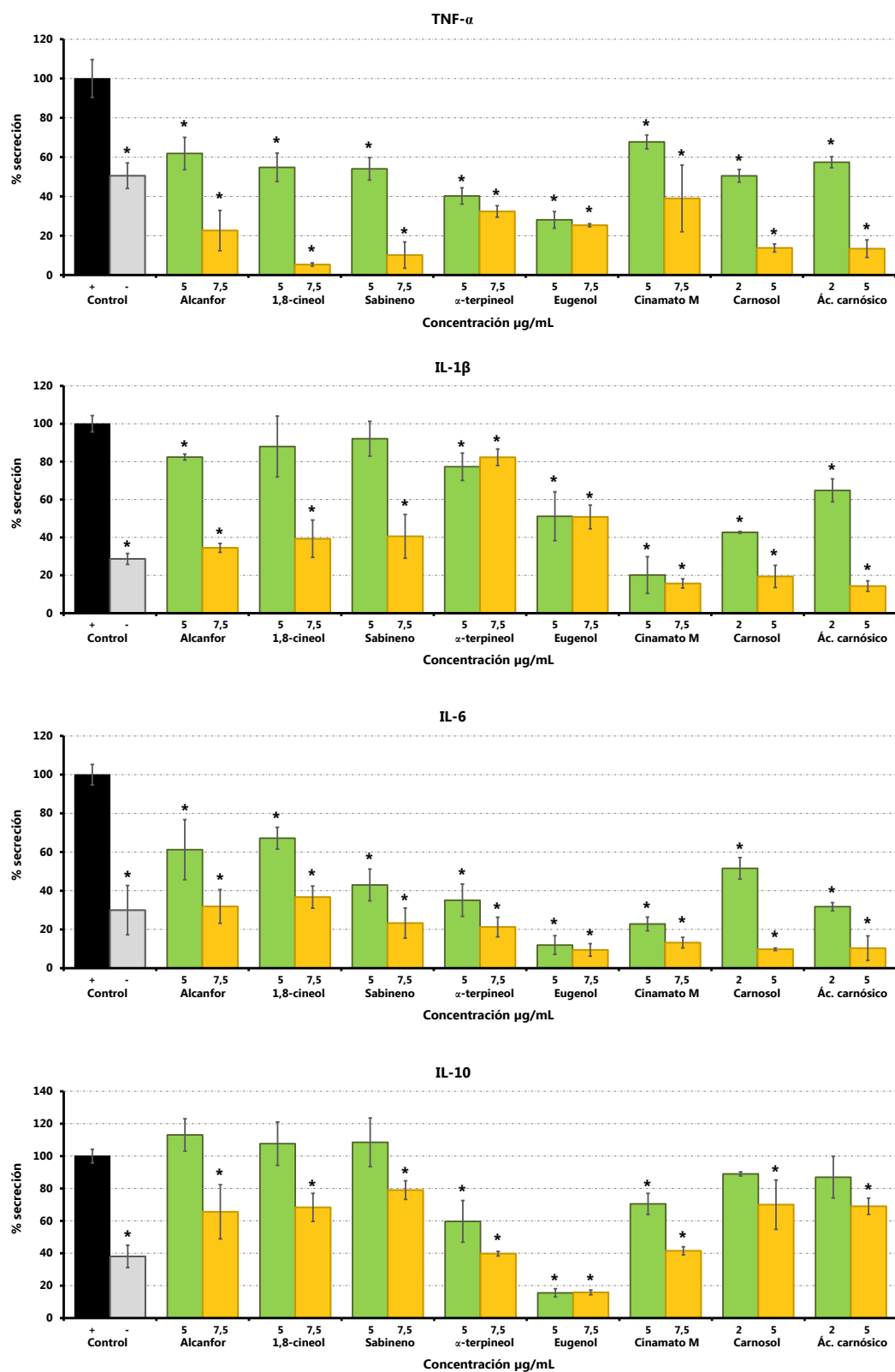


Figura 26: Secreción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 , en macrófagos activados con LDLox en presencia de los patrones tras 24 horas de tratamiento. Cinamato M: cinamato de metilo. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

La secreción de $\text{TNF-}\alpha$ se ha inhibido de forma muy acusada con todos los patrones utilizados. A una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ la secreción ha disminuido, en la mayoría de los casos, hasta niveles cercanos a los basales, pero valores de 7,5 $\mu\text{g/mL}$, han provocado una caída más acusada llegando hasta valores de inhibición de un 90%, tal es el caso del 1,8-cineol y del sabineno. Sin embargo, los compuestos más activos han sido el carnosol y el ácido carnósico, ya que únicamente con 5 $\mu\text{g/mL}$, disminuye la secreción hasta aproximadamente un 90%.

Al igual que en el caso de $\text{TNF-}\alpha$, la secreción de $\text{IL-1}\beta$ ha disminuido significativamente con concentraciones de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ para todos los patrones utilizados. Cabe destacar que las dos concentraciones ensayadas de cinamato de metilo, eugenol y α -terpineol han tenido una actividad similar, siendo los más activos una vez más el ácido carnósico y el carnosol, además del cinamato de metilo.

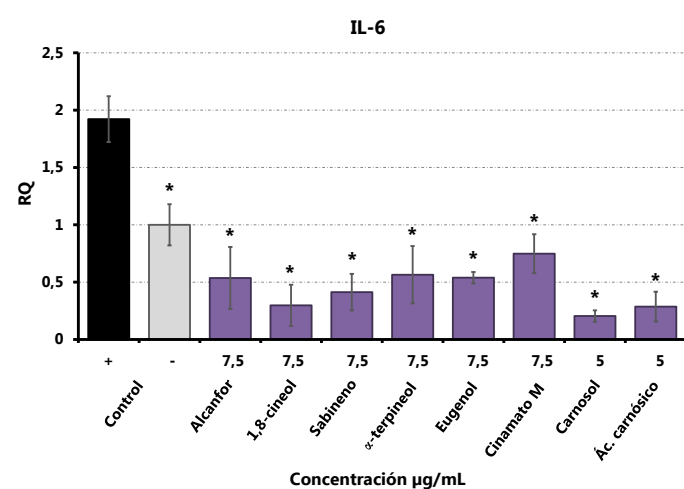
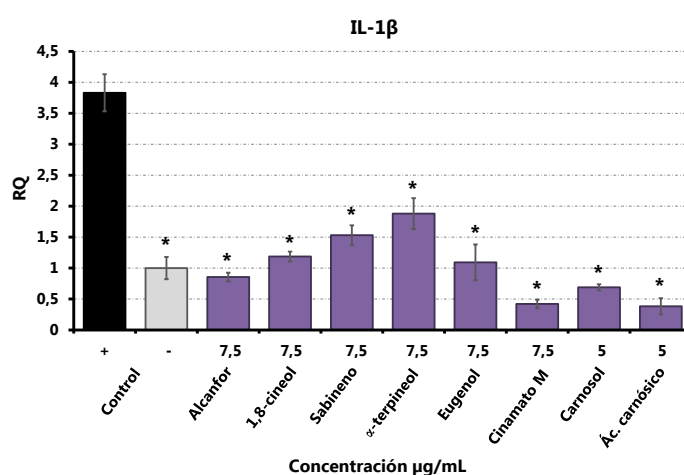
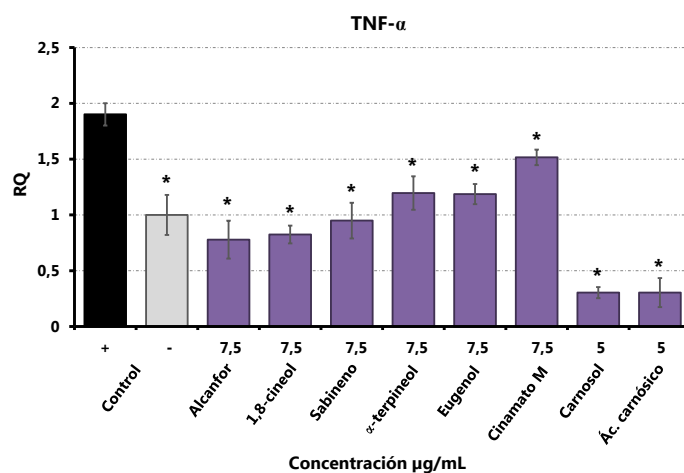
La liberación de IL-6 también se ha reducido tras el tratamiento con los distintos patrones. La secreción ha disminuido hasta los niveles basales para la máxima concentración utilizada y los compuestos más activos han sido el cinamato de metilo, el eugenol, el carnosol y el ácido carnósico.

La incorporación en el medio de cultivo de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ de todos los patrones ha causado un descenso significativo en la secreción de IL-10 , llegando hasta los niveles basales en el caso del α -terpineol, eugenol y cinamato de metilo.

Como se ha descrito en otros apartados de esta memoria, las mismas células ensayadas en la determinación de la secreción de citoquinas sirven de base para estudiar la expresión génica de los genes que codifican las citoquinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 , en presencia de la concentración más elevada de patrones (figura 27).

El tratamiento con los patrones ha ocasionado un descenso en la expresión génica de los genes que codifican $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 , resultados que corroboran los obtenidos para la secreción en el mismo tiempo de ensayo. Los patrones menos activos frente a la inhibición de la expresión génica de $\text{TNF-}\alpha$ han sido el α -terpineol, el eugenol y el cinamato de metilo. Para $\text{IL-1}\beta$ la menor actividad ha correspondido al sabineno y al α -terpineol, mientras que en el caso de IL-6 la actividad de los patrones ha sido similar y para IL-10 la menor actividad se ha encontrado con el 1,8-cineol y el sabineno; hay que

indicar que, como en el resto de citoquinas, el ácido carnósico y el carnosol han dado lugar a valores de expresión génica algo inferiores al resto.



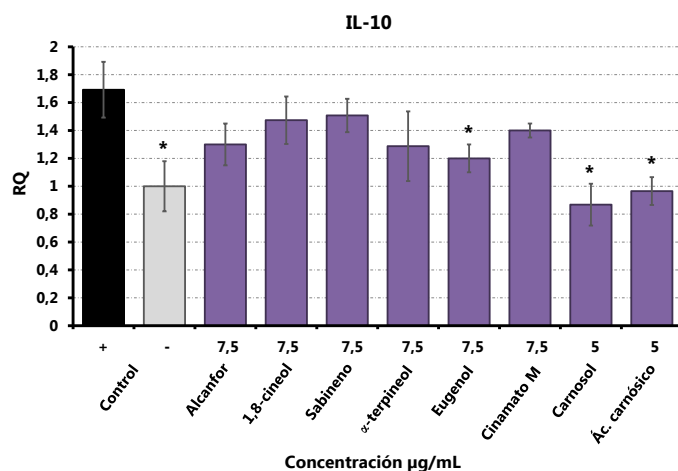


Figura 27: Expresión génica de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ e $IL-10$, en macrófagos activados con LDLox en presencia de los patrones, tras 24 horas de tratamiento. Cinamato M: cinamato de metilo. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Tras el trabajo anterior, se llevó a cabo el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y por cromatografía de líquidos con detector ultravioleta (HPLC-DAD) para confirmar la presencia de los compuestos estudiados previamente en los extractos de las diferentes plantas.

Los resultados obtenidos para el análisis por cromatografía de gases se muestran en la tabla 7.

El aceite esencial procedente del extracto de albahaca contenía mayoritariamente eugenol (41,28%) y éster metílico del ácido cinámico (20,70%). El de mejorana estaba compuesto principalmente por hidrato de cis-sabineno (36,4%), 4-acetato de terpineno y 1-terpineno-4-ol, además de α -terpineol. Finalmente, el aceite esencial de romero presentó esencialmente casi un 55% de 1,8-cineol y un 21% de alcanfor. La determinación por HPLC ha permitido confirmar la presencia de ácido carnósico (18%) y carnosol (1,6%) en el extracto de romero.

Los resultados obtenidos con los patrones justifican la mayor actividad antiinflamatoria del extracto supercrítico de romero, ya que es el único extracto que posee un 18% de ácido carnósico y un 1,6% de carnosol, los patrones puros de ambos compuestos presentan mayor actividad antiinflamatoria que el resto de los ensayados.

Tabla 7: Abundancia relativa en porcentaje de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de los extractos, determinado con GC-MS.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Albahaca	Mejorana	Romero
6,28	α -Pineno	-	-	0,58
6,85	Canfeno	-	-	0,26
8,3	1-Octen-3-ol	-	-	0,04
8,85	β -Pineno	-	-	0,11
10,54	m-Cimeno	-	-	0,75
10,75	Limoneno	-	-	0,37
10,88	1,8-Cineol	0,24	-	54,51
12,89	Hidrato de trans-sabineno	0,11	6,91	-
14,67	Hidrato de cis-sabineno	0,33	36,4	-
14,91	Linalol	4,78	2,76	1,06
17,25	Alcanfor	-	-	21,23
18,5	Borneol	0,77	-	4,86
19,29	1-Terpineno-4-ol	0,57	13,33	1,21
19,85	p-Cimen-8-ol	-	-	0,11
20,1	α -Terpineol	2,98	8,86	5,4
21,12	Verbenona	-	0,93	-
23,84	4- Acetato de terpineno	-	15,85	-
25,6	Acetato de bornilo	0,2	-	0,08
26,46	Carvacrol	-	1,99	-
30,3	Eugenol	41,28	0,99	-
31,4	Copaeno	-	-	0,49
32,05	Ester metílico del ácido cinámico	20,70	-	-
34,5	Cariofileno	0,52	5,13	6,81
36,1	α -Bergamoteno	9,38	1,24	-
37,2	α -Cariofileno	0,51	-	0,71
42,5	γ -Cadineno	12,05	-	-
43,5	δ -Cadineno	-	-	1,18
48,12	Espatulanol	5,58	5,62	-
48,48	Oxido de cariofileno	-	-	0,25

Asimismo, el alcanfor y el 1,8-cineol muestran también una importante actividad antiinflamatoria.

Respecto al extracto de albahaca, el eugenol (41,28%) y el ester metílico del ácido cinámico (20,70%) pueden ser la base de la actividad antiinflamatoria encontrada.

Y por último, el extracto de mejorana presenta un importante contenido en sabineno y terpineol, compuestos que también presentan propiedades antiinflamatorias.

3.1.3 Influencia del tiempo de tratamiento en la actividad antiinflamatoria de los extractos supercríticos de albahaca, mejorana y romero

A continuación se ha evaluado la influencia del tiempo de tratamiento de los macrófagos en la actividad antiinflamatoria de los extractos de albahaca, mejorana y romero, utilizando el modelo de inflamación mediado por oxidación, donde los extractos poseían una mayor actividad. Así, se ha determinado tanto la secreción como la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 y la antiinflamatoria IL-10 , a distintos tiempos de ensayo: 6, 12 y 24 horas.

Los resultados de secreción de citoquinas tras distintos tiempos de tratamiento se representan en las cinéticas de liberación indicadas en la figura 28. En ellas se cuantifica el valor de secreción como pg de proteína por cada mL de medio de cultivo. Se puede observar cómo la activación del proceso inflamatorio con la adición de LDLox incrementa, de manera gradual, la secreción de las citoquinas tanto pro como antiinflamatorias (control +). Tras 6 horas de tratamiento, el primer punto de ensayo, ya se han obtenido diferencias significativas entre la situación basal y la situación patológica, salvo para la IL-10 , que como está descrito en la bibliografía tiene una secreción más tardía y han sido necesarias 12 horas para apreciar las diferencias. Resultados similares fueron encontrados por Wasaporn y col. (2010), donde la secreción de IL-10 se incrementa a partir de las 6 horas de tratamiento, la de IL-6 tras 3 horas y la de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ una vez alcanzadas las 2 horas.

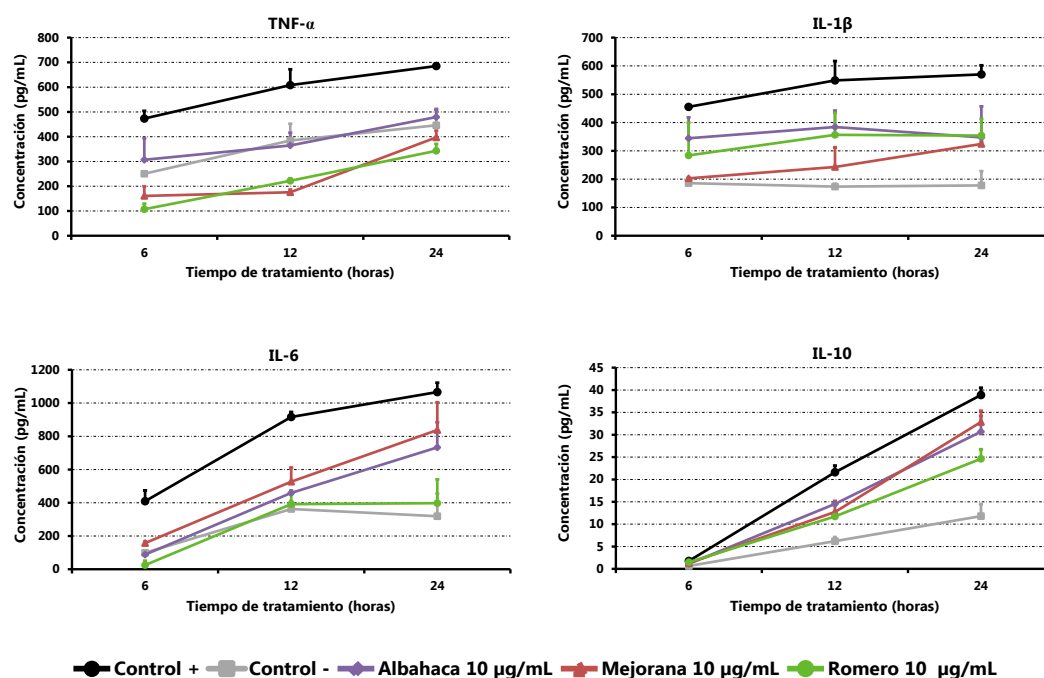


Figura 28: Cinéticas de secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con 10 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos supercríticos de albahaca, mejorana y romero.

Tras 6 horas de tratamiento de los macrófagos con los extractos supercríticos de las plantas empleadas se observa una disminución importante en la secreción de TNF- α , hecho que se mantiene al aumentar el tiempo del tratamiento. Los extractos de romero y mejorana han sido los más efectivos reduciendo la secreción por debajo del nivel basal. El extracto de albahaca ha presentado valores de secreción de TNF- α muy parecidos al control negativo para todos los tiempos ensayados. En el caso de IL-1 β , a las 6 horas ya se evidencia una disminución en la liberación de esta citoquina para todos los extractos ensayados, proceso que se acentúa tras 12 horas de tratamiento, dadas las diferencias con el control positivo. De forma similar, transcurridas 6 horas, se observa una disminución en la liberación de IL-6, mucho más evidente a las 12 horas.

Sin embargo, la secreción de IL-10 se ha comportado de forma diferente al resto de citoquinas ensayadas. A las 6 horas la secreción ha sido muy pequeña, sin diferencias entre los tratamientos. A las 12 horas ha existido un incremento en la secreción, situándose los niveles de los tratamientos con los extractos supercríticos en valores intermedios entre el control positivo y el negativo. Tras 24 horas, los tratamientos con

extractos de albahaca y mejorana presentaron unos niveles de secreción similares, siendo algo inferiores para el romero.

Como resumen, se puede indicar que para los tres extractos estudiados, 6 horas de tratamiento han sido suficientes para observar una disminución en la liberación de las tres citoquinas proinflamatorias estudiadas, aunque para algunas de ellas esta acción se ha apreciado mejor a las 12 horas de tratamiento. En el caso de la IL-10 han sido necesarias 24 horas de tratamiento para desencadenar este efecto.

La influencia del tiempo de tratamiento de los macrófagos con los extractos en la expresión génica de citoquinas, se evalúa en aquellas células en las que se ha determinado su secreción. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 29. La activación de las células con LDLox ha provocado un incremento muy acusado en la expresión génica de todas las citoquinas. Además ese efecto se ha observado primordialmente a las 6 horas de tratamiento, con mayores diferencias entre el control positivo y el negativo que las observadas a tiempos de incubación más largos.

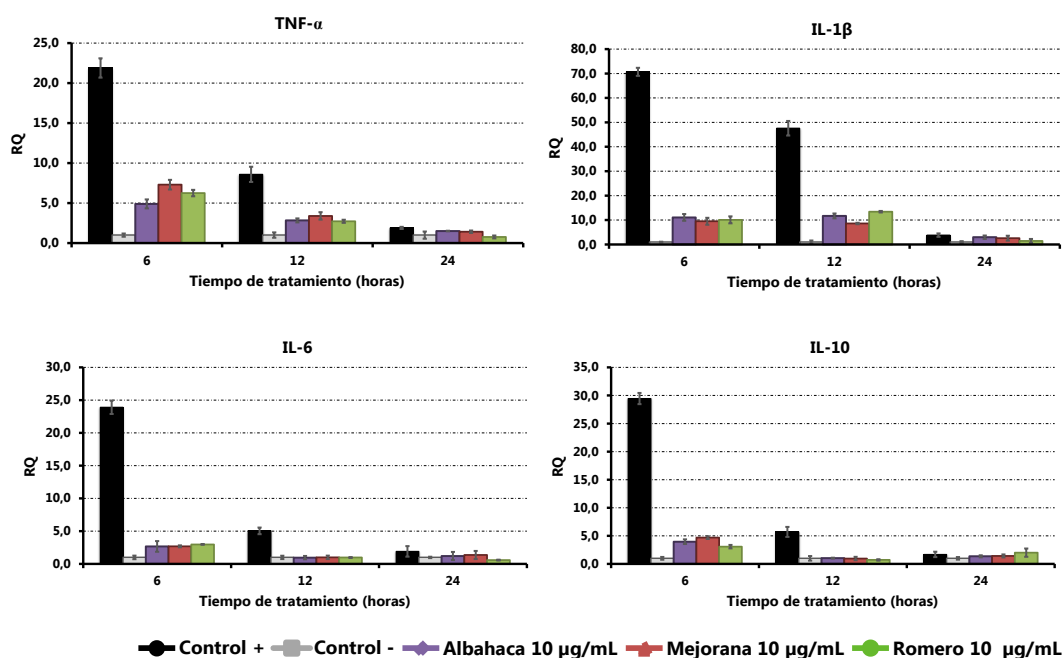


Figura 29: Cinéticas de expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con 10 μ g/mL de los extractos supercríticos de albahaca, mejorana y romero

Cuando se añaden los extractos al medio de cultivo, la expresión génica de $\text{TNF-}\alpha$ se ha inhibido de forma muy acusada tras 6 horas de tratamiento, manteniéndose la inhibición tras 12 horas de tratamiento, aunque en menor proporción. Transcurridas 24 horas de tratamiento la expresión génica ha tendido a igualarse a la situación basal, puesto que las células ya han respondido a la activación por LDLox.

Un patrón de expresión similar al de $\text{TNF-}\alpha$ se ha encontrado en el caso de $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 , con una inhibición muy importante de la expresión tras 6 horas de tratamiento para todos los extractos supercríticos, valor que se ha mantenido, en menor medida, tras 12 horas, alcanzándose una situación de equilibrio a las 24 horas.

De los resultados alcanzados, se puede inferir que la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias tras 6 horas de tratamiento ha mostrado una disminución muy acusada para todos los extractos ensayados, hecho que en los estudios de liberación de citoquinas no se ha apreciado hasta un periodo de tiempo superior. Este resultado es lógico, ya que la expresión génica siempre es un proceso anterior en el tiempo a la liberación de las citoquinas.

Al inicio de la presente sección se planteaba la posibilidad de que los extractos supercríticos de plantas aromáticas pudieran tener actividad antiinflamatoria. Tras los experimentos realizados se puede concluir que los extractos supercríticos de las seis plantas aromáticas testadas presentaron esta propiedad, siendo además más activas en el modelo de inflamación dependiente de oxidación. De todos los extractos ensayados, destaca la actividad del romero, seguida de la de albahaca y mejorana. Dicha capacidad antiinflamatoria se ha podido relacionar, mediante la utilización de patrones, con la composición química de dichos extractos, demostrándose, además, que 6 horas de tratamiento son suficientes para que dichos extractos ejerzan su actividad antiinflamatoria a nivel de la secreción y expresión génica de citoquinas con actividad proinflamatoria.

3.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos mediante extracción con líquidos presurizados

Como se ha indicado, además de aplicar la extracción con fluidos supercríticos como técnica potencialmente más adecuada, se estudió, a modo comparativo, la extracción con líquidos presurizados, por entender que sus menores costes operativos podrían potenciar la viabilidad comercial de los extractos antiinflamatorios objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Para llevar a cabo la comparación de tecnologías de extracción, se seleccionaron la albahaca, la mejorana y el romero como las plantas con mayor actividad antiinflamatoria, según los resultados disponibles hasta el momento.

La PLE se ha llevado a cabo empleando como disolventes agua, etanol y una mezcla de etanol y agua en una proporción 1:1, obteniéndose de cada planta tres extractos diferentes. Previo al estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos de PLE, se caracterizó la actividad antioxidante de los mismos, con objeto de seleccionar de entre los tres tipos de extractos obtenidos por planta, aquel que presentara mejores características, puesto que, como se ha indicado en la sección anterior, existen diversos ejemplos bibliográficos en los que se describe la relación existente entre las actividades antioxidante y antiinflamatoria (Zhang y col., 2011; Chohan y col., 2012; Ravipati y col., 2012). Además este hecho se ha puesto de manifiesto en los resultados previos obtenidos con extractos supercríticos y un modelo dependiente de oxidación, y que indican una posible relación entre la actividad antioxidante y la antiinflamatoria, para los extractos de romero y albahaca.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante, medida por el método del ABTS como mmol de trolox por g de extracto. Comparando los tres tipos de extractos para cada planta, el extracto obtenido con la mezcla de agua y etanol presenta una mayor actividad antioxidante en todos los casos, por lo que se seleccionaron para llevar a cabo los ensayos de actividad antiinflamatoria. De las tres plantas estudiadas el romero ha presentado una mayor capacidad antioxidante, seguido de la mejorana y en último lugar la albahaca.

Tabla 8: Medida de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos por PLE

Extracto		mmol trolox/g extracto
Albahaca	Etanol	0,356 ± 0,011
	Agua:Etanol	0,846 ± 0,056
	Agua	0,410 ± 0,032
Mejorana	Etanol	0,406 ± 0,036
	Agua:Etanol	1,045 ± 0,055
	Agua	0,820 ± 0,034
Romero	Etanol	0,396 ± 0,022
	Agua:Etanol	1,384 ± 0,098
	Agua	1,274 ± 0,166

3.2.1 Medida de la actividad antiinflamatoria

Tomando como base los extractos obtenidos por PLE con la mezcla agua y etanol 1:1, se ha realizado la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*, siguiendo las mismas condiciones descritas en la sección anterior.

3.2.1.1 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS

Los extractos de albahaca, mejorana y romero obtenidos por PLE han sido adicionados a los macrófagos a una concentración de 10 y 20 µg/mL, siendo esta última la máxima concentración determinada como no tóxica en los ensayos de citotoxicidad (datos no mostrados). Además, se han empleado las mismas concentraciones que en el caso previo de los extractos supercríticos, para poder comparar los resultados y determinar qué técnica permite obtener extractos con mayor efecto antiinflamatorio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30, donde además se incluyen los datos para la indometacina, ensayada a 5 µg/mL.

La incorporación de los extractos obtenidos por PLE en el medio de cultivo de macrófagos activados, ha ocasionado una reducción de la secreción de todas las citoquinas proinflamatorias. Así, concentraciones de 20 µg/mL de los tres extractos han reducido significativamente la secreción de TNF-α, alcanzando cifras cercanas al 60% en el caso del romero.

La incorporación de 20 µg/mL de los distintos extractos también ha producido una disminución de la secreción de IL-1 β , postulándose de nuevo el romero como el extracto más activo, con valores similares a los obtenidos con la indometacina. La inhibición de la secreción de IL-6 ha sido más importante que en las citoquinas analizadas previamente. La incorporación de 10 µg/mL de los extractos ha reducido la secreción en un 60% para las tres plantas. Respecto a la IL-10, se han requerido 20 µg/mL de mejorana y romero para reducir su secreción significativamente hasta un 20%.

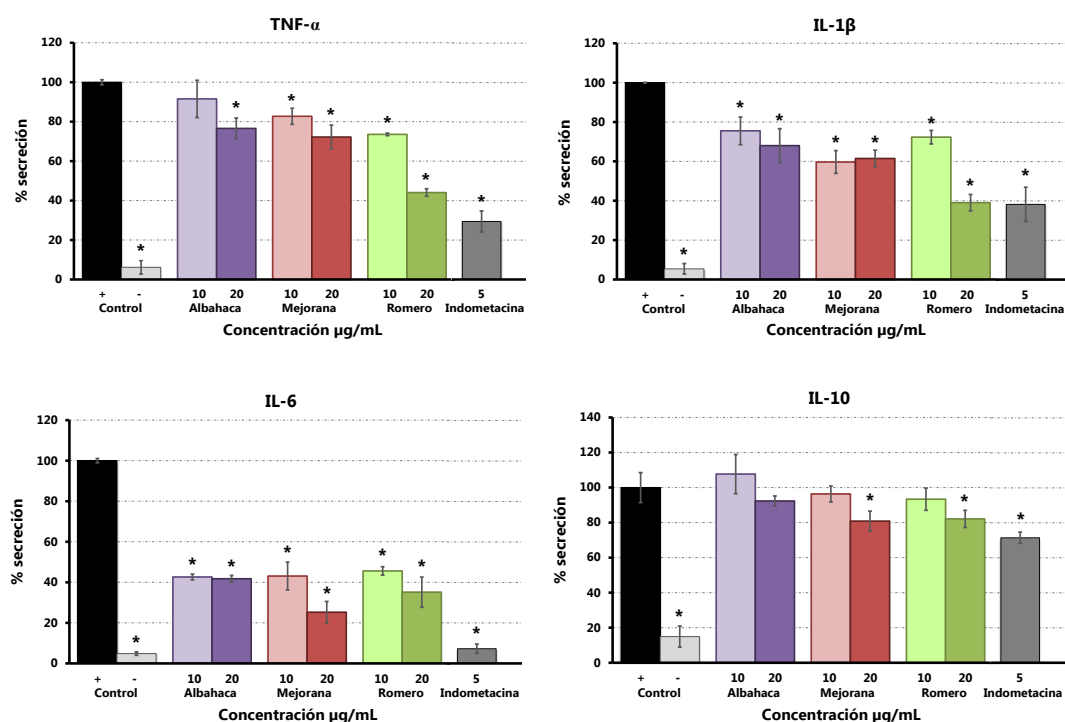


Figura 30: Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en macrófagos activados con LPS en presencia de extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero tras 24 horas de tratamiento. * $p < 0,05$ respecto al control +.

La concentración utilizada de los extractos obtenidos por PLE para la medida de la expresión génica ha sido de 20 µg/mL. Los resultados obtenidos tras el tratamiento de las células con los extractos de PLE de albahaca, mejorana y romero (figura 31) corroboran los encontrados para la secreción de citoquinas al medio de cultivo, ya que se observa un descenso en la expresión génica de todas las citoquinas. Sin embargo, las tres plantas han inhibido la expresión génica hasta unos niveles en los que no se han apreciado diferencias

entre los tratamientos, salvo en el caso de $\text{TNF-}\alpha$ donde el romero ha sido ligeramente más activo.

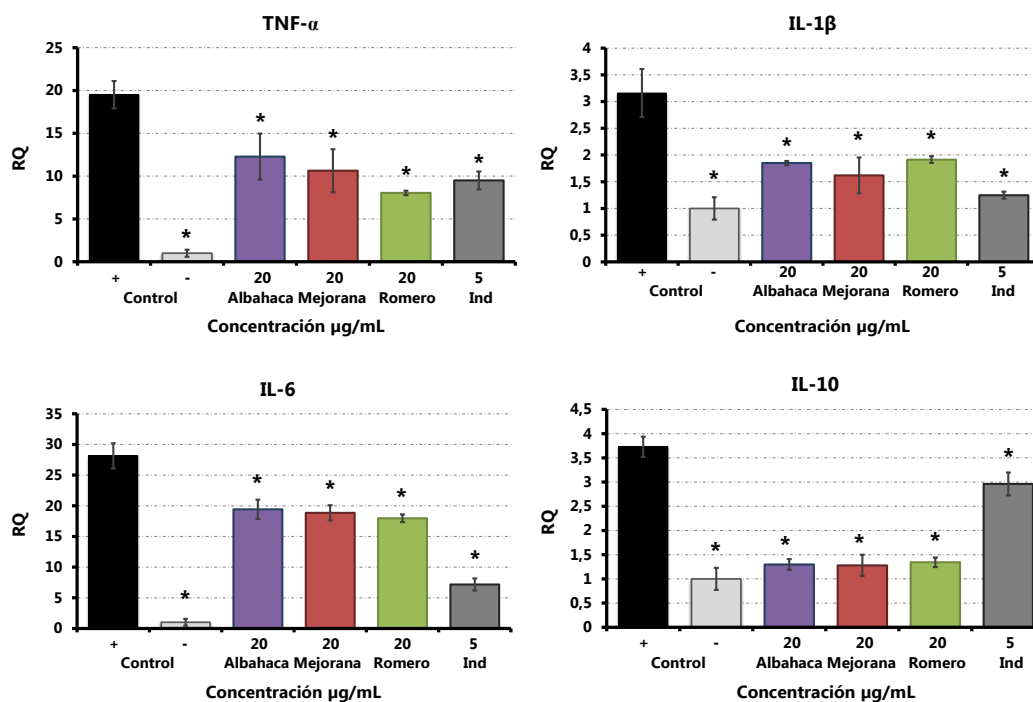


Figura 31: Expresión génica de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 en macrófagos activados con LPS tras 24 horas de tratamiento. Ind: indometacina. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Cuando se compara la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por las dos técnicas de extracción ensayadas, se puede decir que tanto los extractos supercríticos como los obtenidos por PLE, poseen actividad antiinflamatoria ya que reducen la secreción de las citoquinas proinflamatorias estudiadas. En el caso de la albahaca y la mejorana, no se han encontrado diferencias importantes en la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por SFE y por PLE, mientras que el extracto supercrítico de romero es más activo que el obtenido por PLE.

Respecto a la bibliografía, no se han encontrado estudios de actividad antiinflamatoria empleando extractos obtenidos por PLE para ninguna de estas plantas, pero si comparamos estos datos con los obtenidos empleando extractos sólido-líquido de etanol y agua convencionales, cabe destacar que menores concentraciones producen un efecto mayor. En este sentido, Cheung y Tai (2007) demostraron la actividad antiinflamatoria de un extracto sólido-líquido de romero obtenido con un 70% de etanol,

basada en su capacidad para reducir la expresión génica de IL-1 β y COX-2, pero no la de TNF- α e iNOS, tras la incorporación en el medio de cultivo de macrófagos murinos activados con LPS, de concentraciones superiores a 25 μ g/mL del extracto.

3.2.1.2 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox

Los resultados obtenidos para este modelo de inflamación dependiente de oxidación, se muestran en la figura 32. Los extractos de las tres plantas obtenidos por PLE han ocasionado una disminución de la secreción de TNF- α con respecto al control positivo. Concentraciones de 20 μ g/mL de los extractos disminuyen la secreción, al menos, hasta el nivel basal.

La incorporación de LDLox en el medio de cultivo ha incrementado la secreción de IL-1 β en un 70%, llegando a revertirse este proceso de activación cuando se incorpora el extracto de mejorana obtenido por PLE, a una concentración de 20 μ g/mL. Un menor efecto han tenido la albahaca y el romero, cuya inhibición de la secreción solo ha llegado hasta un 50-55%. Los tres extractos obtenidos por PLE han llegado a igualar e incluso a superar el efecto de inhibición provocado por la indometacina.

La adición de los extractos ha disminuido la secreción de IL-6, presentando una mayor actividad para la mejorana y el romero, en tal caso los niveles de secreción han llegado a disminuir hasta asemejarse a los basales. En el caso de la indometacina la secreción se ha inhibido hasta en un 90%, estando los niveles de secreción muy por debajo de la situación basal.

Al igual que el resto de las citoquinas medidas, la secreción de IL-10 se ha incrementado tras la incorporación de LDLox. El tratamiento con los extractos obtenidos por PLE ha sido dispar para la secreción de IL-10: la albahaca y la mejorana han disminuido ligeramente la secreción, mientras que el romero lo ha hecho en un 60 %.

De las tres plantas ensayadas, los extractos de mejorana y romero obtenidos por PLE han mostrado una mayor actividad de inhibición de la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 en este modelo de inflamación dependiente de oxidación.

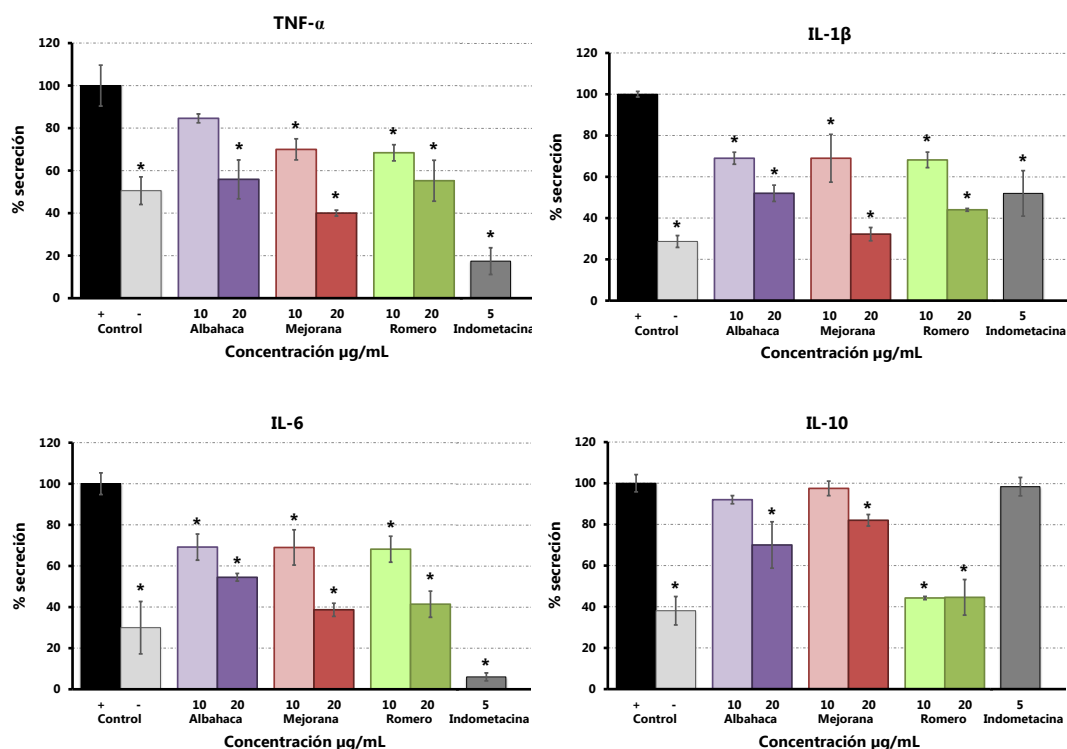


Figura 32: Secreción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 , en macrófagos activados con LDLox en presencia de extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero tras 24 horas de tratamiento. * $p < 0,05$ con respecto al control +.

Los resultados obtenidos para la expresión génica aparecen en la figura 33. Todos los extractos obtenidos por PLE han disminuido la expresión génica de las citoquinas estudiadas, aunque, el romero ha mostrado una mayor capacidad para inhibir la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias, alcanzando los niveles basales, salvo en el caso de la $\text{IL-1}\beta$.

Cuando se compara la actividad antiinflamatoria de los distintos extractos siguiendo los dos modelos empleados, se observa que los extractos han sido más activos en el modelo de inflamación mediado por las LDLox , ya que a $20 \mu\text{g/mL}$ todos los extractos han sido capaces de disminuir la liberación de citoquinas hasta niveles más próximos a los basales, en contraposición con la estimulación con LPS.

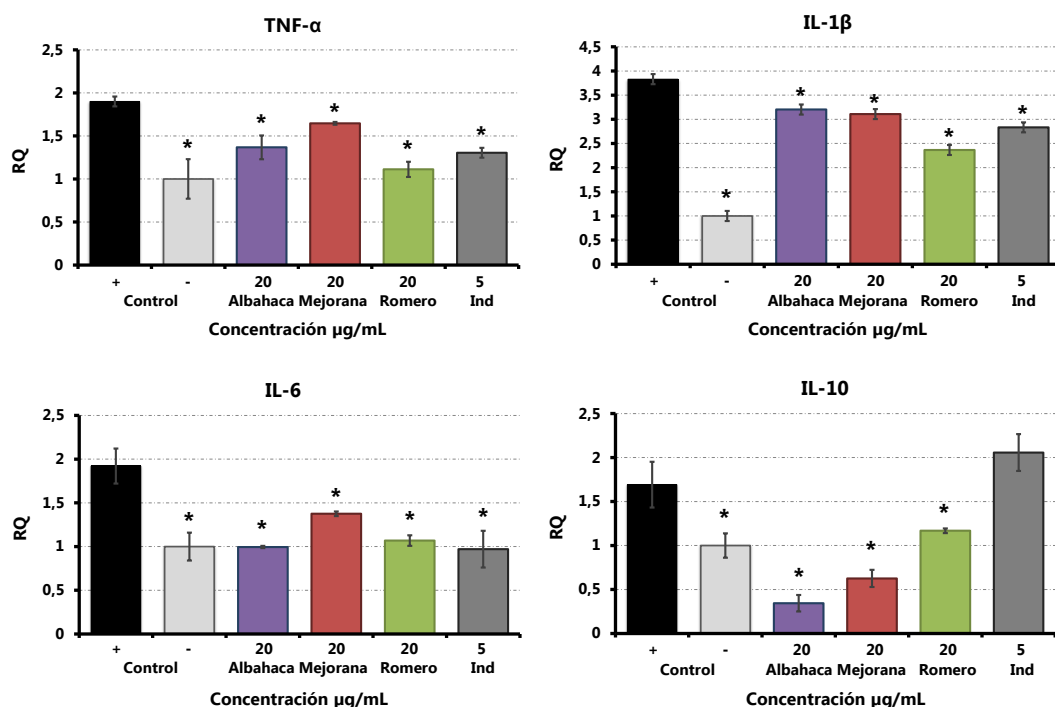


Figura 33: Expresión génica de *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-10* en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento. Ind: indometacina. * $p < 0.05$, con respecto al control +.

Al estudiar la actividad antiinflamatoria, en el modelo dependiente de oxidación, de los extractos obtenidos por PLE y por fluidos supercríticos existe disparidad, dependiendo ésta del material de partida. Para la mejorana, el extracto obtenido por PLE ha sido más activo que el obtenido por fluidos supercríticos, mientras que para la albahaca la actividad ha sido similar; en el caso del romero la mayor actividad corresponde al extracto supercrítico. De todos los extractos estudiados, el extracto supercrítico de romero ha presentado la mayor actividad antiinflamatoria, ya que una concentración de 10 μ g/mL de extracto ha inhibido la secreción de las citoquinas proinflamatorias en mayor medida que el resto de los extractos para concentraciones similares.

3.2.2 Relación de la composición química de los extractos obtenidos por PLE con su actividad antiinflamatoria.

Al igual que en el caso de los extractos supercríticos, se ha llevado a cabo el análisis de los extractos PLE por cromatografía de líquidos con detector de haz de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS).

Mediante HPLC se han identificado el carnosol y el ácido rosmarínico (tabla 9). En los tres extractos se ha encontrado ácido rosmarínico, estando en mayor cantidad en el extracto de mejorana, lo que supone el doble de ácido rosmarínico que el encontrado para albahaca. En el caso del extracto de romero, además de ácido rosmarínico (un 4,93% en peso), el extracto contiene también un 2,56% en peso de carnosol.

Tabla 9: Porcentaje en peso de los compuestos presentes en los extractos obtenidos por PLE determinado con HPLC.

Extracto	% carnosol	% ácido rosmarínico
Albahaca	-	2,60
Mejorana	-	5,47
Romero	2,56	4,93

Mediante el análisis por GC-MS de los tres extractos no se ha detectado la presencia de diterpenos ni otros compuestos fenólicos característicos del aceite esencial de este tipo de plantas.

Es evidente que la composición de los extractos obtenidos por PLE es muy diferente a la obtenida por fluidos supercríticos y que más que tecnologías alternativas, ambas pueden considerarse complementarias ya que dan lugar a extractos de composición diferente y cuyas actividades pueden ser aditivas.

A continuación, se estudió la actividad antiinflamatoria de los patrones puros de los compuestos identificados en los extractos PLE. Aunque el carnosol ya se había estudiado en el apartado anterior, los datos obtenidos se incorporan en este apartado, de nuevo, para facilitar la comparación.

Como es preceptivo, antes del estudio de la actividad antiinflamatoria, se ha estudiado la toxicidad del ácido rosmarínico, estableciéndose en 7,5 µg/mL la máxima concentración no tóxica para las células. Por lo tanto, las concentraciones que se han ensayado han sido de 5 y 7,5 µg/mL.

Utilizando el modelo de inflamación dependiente de oxidación se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 34. En este modelo de inflamación ambos patrones

han inhibido la secreción de todas las citoquinas analizadas. La secreción de $\text{TNF-}\alpha$ ha disminuido, tanto con carnosol como con ácido rosmarínico, por debajo de los niveles basales, siendo mayor el efecto del carnosol. En el caso de $\text{IL-1}\beta$ también se ha inhibido la secreción con ambos compuestos, siendo de nuevo más activo el carnosol. El mismo modelo ha seguido la secreción de IL-6 , donde 5 $\mu\text{g/mL}$ de ambos compuestos producen un descenso por debajo de los niveles basales. El efecto en IL-10 ha sido menor con el carnosol, mientras que el ácido rosmarínico ha provocado un descenso en la secreción hasta niveles basales. Cabe destacar que la secreción de todas las citoquinas se ha inhibido con las dos concentraciones de ácido rosmarínico de forma similar, no habiendo diferencias entre ambas.

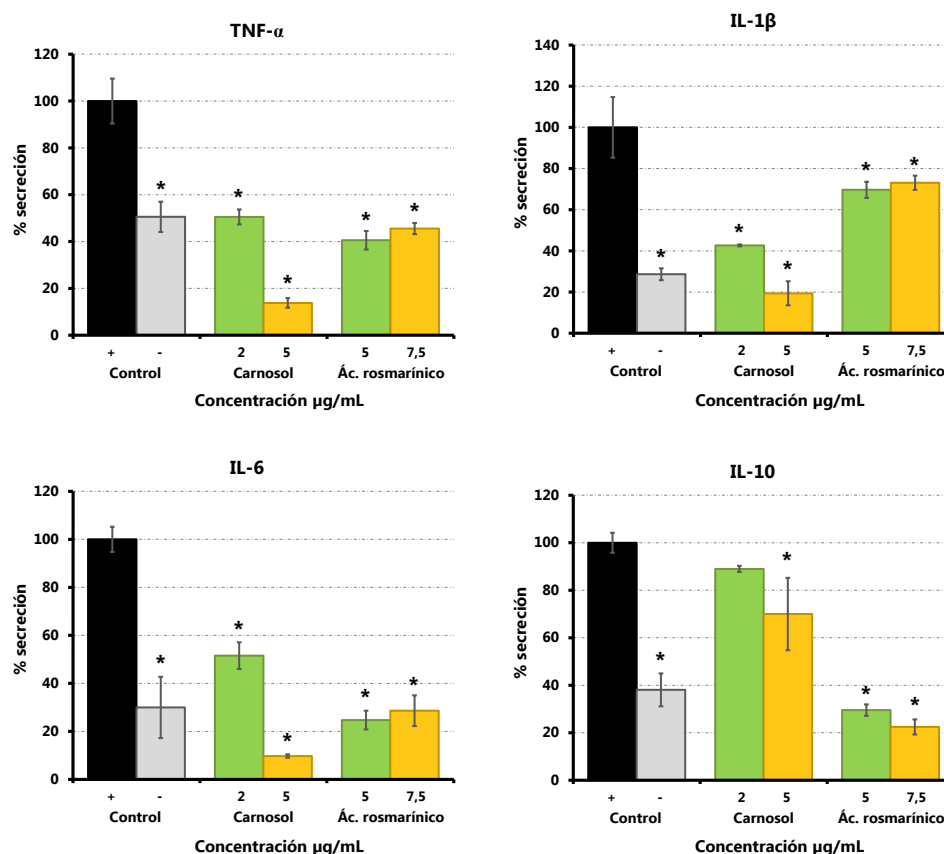


Figura 34: Secreción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y IL-10 , en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento con los patrones de carnosol y ácido rosmarínico. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

También se ha determinado la expresión de los genes que codifican $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 en las células en que se determinó previamente la secreción de citoquinas tras 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35. El efecto de inhibición de la

expresión génica ha sido muy similar en los dos compuestos puros ensayados, aunque la concentración usada de carnosol ha sido inferior. La disminución tanto de $\text{TNF-}\alpha$ como de $\text{IL-1}\beta$ e IL-10 ha llegado hasta valores basales en los tratamientos con carnosol y ácido rosmarínico. En el caso de la expresión de IL-6 , se han alcanzado niveles inferiores al control negativo. Estos resultados corroboran, por tanto, lo obtenido en la secreción de citoquinas al medio de cultivo.

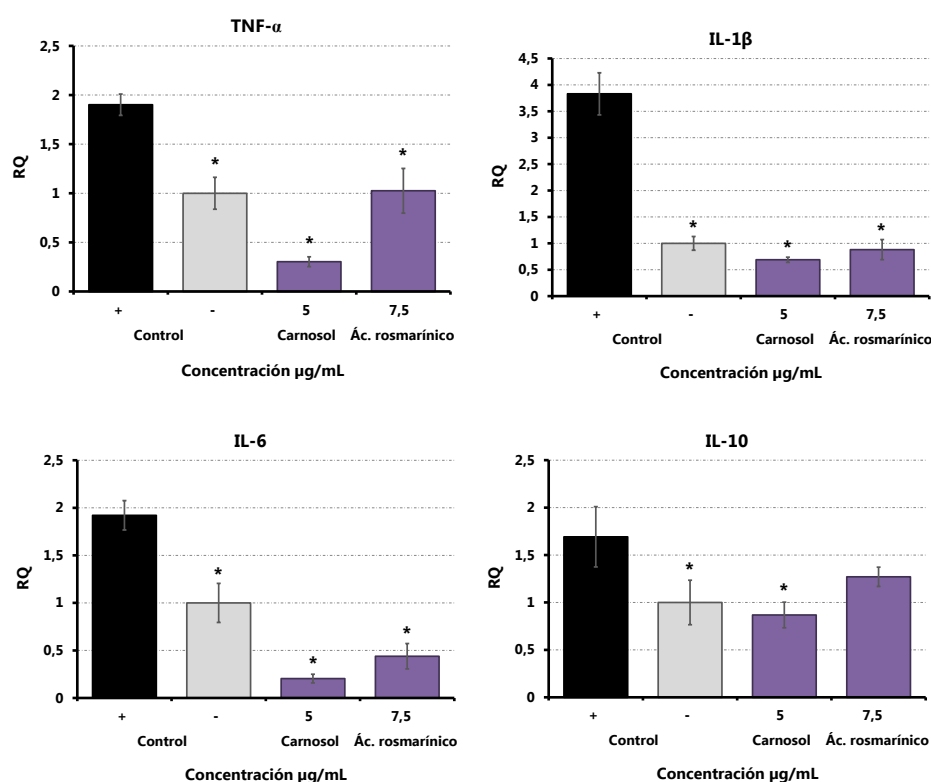


Figura 35: Expresión génica de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 y IL-10 , en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento con los patrones de carnosol y ácido rosmarínico. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Por lo tanto, se ha puesto de manifiesto que el ácido rosmarínico y el carnosol, compuestos encontrados en los extractos obtenidos por PLE, poseen una importante actividad antiinflamatoria. El extracto de mejorana, con casi un 5,5% de ácido rosmarínico, ha presentado una importante actividad antiinflamatoria, similar a la del extracto de romero, que aunque contenía menor cantidad de rosmarínico contaba con una cierta cantidad de carnosol. Finalmente, el extracto de albahaca con un bajo porcentaje de ácido rosmarínico, ha mostrado la menor actividad antiinflamatoria.

3.2.3 Influencia del tiempo de tratamiento en la actividad antiinflamatoria de los extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero

Debido a que los extractos han sido más activos en el modelo de inflamación mediado por oxidación, el estudio de la influencia del tiempo de tratamiento, con este tipo de extractos, se ha realizado solamente en este modelo. Dicho estudio se ha efectuado en idénticas condiciones a las citadas en el apartado anterior (extractos supercríticos).

Los resultados obtenidos para la liberación de citoquinas a las 6, 12 y 24 horas, para 20 µg/mL de los extractos se muestran en la figura 36. La secreción de TNF- α se ha reducido desde las 6 horas de incubación con los extractos, atribuyéndose una mayor actividad al de mejorana. A las 12 horas de incubación los niveles de secreción con la mejorana han seguido manteniéndose por debajo del control negativo, nivel por debajo del cual también se ha encontrado la secreción con el extracto de romero. Ha sido ya a las 24 horas cuando todos los extractos han llegado a inhibir la secreción hasta niveles inferiores a los de la situación basal.

Se observa que la liberación de IL-1 β en presencia de los extractos de mejorana y romero, tras 6 horas de tratamiento, ya presentan valores por debajo de los niveles basales del control negativo. A las 12 horas las tres plantas han tenido unos niveles de secreción similares, que se han mantenido tras 24 horas para la mejorana y el romero, y que ha presentado unos niveles ligeramente superiores de secreción para la albahaca.

Desde el primer periodo de incubación, 6 horas, la secreción de IL-6 se ha reducido con el tratamiento de los extractos obtenidos por PLE. El extracto de albahaca ha mostrado la menor actividad. Sin embargo, los extractos obtenidos a partir de mejorana y romero se han mantenido durante todo el ensayo en valores similares a los del control negativo.

El nivel de secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en presencia de LDLox ha sido mucho menor que el resto de citoquinas estudiadas, además ha incrementado su secreción únicamente a partir de las 6 horas, no observándose diferencias en el primer punto de ensayo entre los controles positivo y negativo. Se ha podido apreciar un efecto más acusado de los extractos únicamente tras 24 horas de tratamiento.

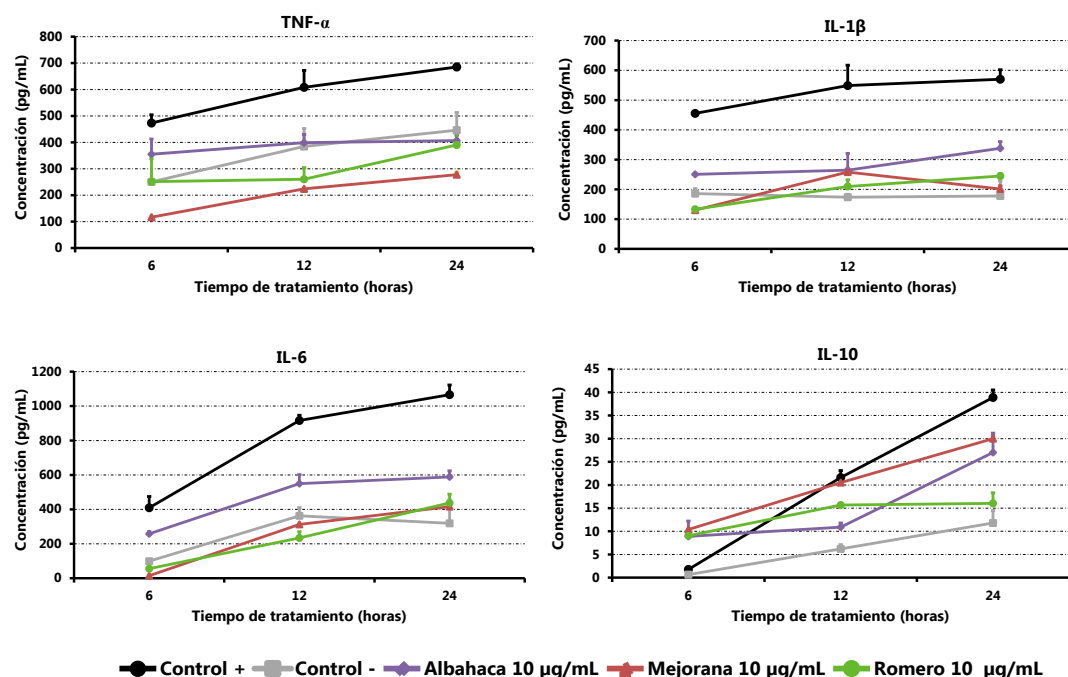


Figura 36: Cinéticas de secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con 20 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero.

Respecto a los resultados de la expresión génica (figura 37), la incorporación de los extractos ha provocado, desde las 6 horas de incubación, un descenso muy acusado en la expresión génica de TNF- α . Este efecto se ha prolongado a lo largo del tiempo, aunque ha sido menor tras 12 horas de incubación mientras que a tiempos de incubación prolongados, 24 horas, se tiende a volver al equilibrio de la situación basal. Similar efecto se ha encontrado en la expresión génica de IL-1 β , IL-6 e IL-10.

Por tanto, 6 horas de incubación ha sido el tiempo en el que las diferencias de expresión génica entre el control positivo y negativo han sido mayores y donde además se hace más patente el efecto de inhibición de la expresión motivado por la incorporación de los extractos en el medio de cultivo. Esta mayor actividad de los extractos en la expresión génica a las 6 horas está en consonancia con los resultados obtenidos de secreción, donde el efecto antiinflamatorio de los extractos se comienza a observar a las 6 horas, pero es más patente a las 12 ó 24 horas. Se trata de resultados coherentes puesto que la secreción de citoquinas es un evento posterior a su expresión génica.

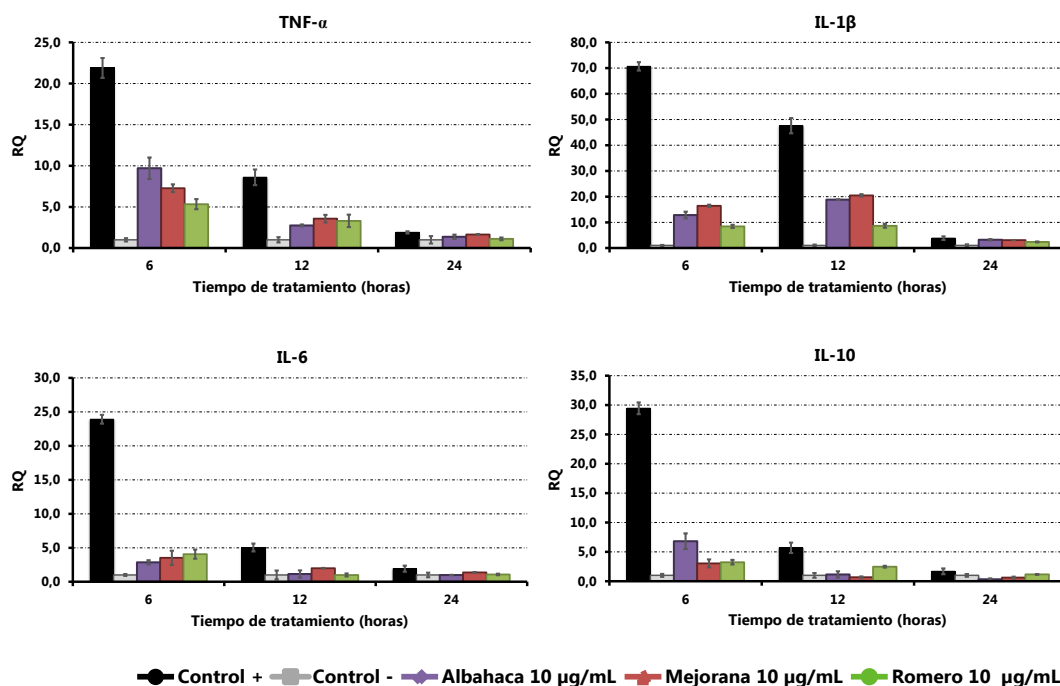


Figura 37: Cinéticas de expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 a las 6, 12 y 24 horas de tratamiento con 20 μ g/mL de los extractos obtenidos por PLE de albahaca, mejorana y romero.

Como conclusión de esta sección se puede decir que el empleo de la técnica PLE ha dado lugar a unos extractos de albahaca, mejorana y romero que poseen una actividad antiinflamatoria importante. Dicha actividad antiinflamatoria ha sido mayor cuando se ha utilizado el modelo de inflamación mediado por oxidación, hecho que se ha relacionado con la buena capacidad antioxidante que tienen los extractos, siendo los más activos los de mejorana y romero. En este sentido, es interesante destacar la importante actividad antiinflamatoria del extracto de mejorana obtenido por PLE, ya que mediante esta técnica de extracción se ha obtenido un extracto con ácido rosmarínico, compuesto que no estaba presente en el extracto supercrítico y que ha demostrado tener actividad antiinflamatoria. Al igual que en el extracto de mejorana, en el de romero también se ha detectado ácido rosmarínico, además de una cierta cantidad de carnosol.

Cuando se comparan las dos técnicas de extracción, fluidos supercríticos versus líquidos presurizados, el extracto que ha presentado una mayor actividad antiinflamatoria ha sido el extracto supercrítico obtenido a partir de hojas de romero. Mediante la extracción con fluidos supercríticos, se ha obtenido un extracto de romero con un 18% de ácido carnósico y un 1,6% de carnosol, compuestos que han demostrado poseer una

importante actividad antiinflamatoria, además de otros como el 1,8-cineol y el alcanfor que también poseen una cierta capacidad antiinflamatoria. Además, este extracto ha demostrado tener una importante actividad antioxidante, que podría estar relacionada con su mayor actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación dependiente de oxidación. Por lo tanto, se ha seleccionado la técnica de extracción con fluidos supercríticos y hojas de romero como materia prima para optimizar el procedimiento de extracción, con el objetivo de conseguir un ingrediente funcional con una alta actividad antiinflamatoria.

3.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos supercríticos de romero obtenidos en distintas condiciones

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores muestran que el extracto supercrítico de romero ha presentado una mayor actividad antiinflamatoria. Esta actividad se ha asociado a su contenido en ácido carnósico y carnosol, aunque también podría contribuir la presencia en el extracto de 1,8-cineol y alcanfor.

A la vista de lo anterior, se consideró interesante optimizar las condiciones de extracción con el objeto de obtener un producto con un contenido superior en ácido carnósico y carnosol y, por tanto, una actividad antiinflamatoria más alta.

3.3.1 Extracción y caracterización química de los extractos supercríticos de romero

La extracción supercrítica de las hojas de romero se ha llevado a cabo utilizando dos procedimientos diferentes. En uno de los casos se ha empleado el procedimiento descrito para la obtención de los extractos evaluados en la sección anterior (romero A), mientras que en el otro se ha ensayado un método con 5% de etanol como co-solvente (romero B). Las condiciones de extracción del romero A están sujetas a una presión de 30 MPa y una temperatura de 40 °C, mientras que para el romero B, además del empleo de etanol como co-solvente, la presión se ha disminuido hasta los 15 MPa y la temperatura se mantuvo en 40 °C. Las condiciones utilizadas para la obtención del romero B están encaminadas a conseguir un incremento en la cantidad de ácido carnósico y carnosol en el extracto, y se basan en estudios previos realizados por otros miembros del Grupo de Investigación (Vicente y col., 2012a; Vicente y col., 2012b).

Una vez obtenidos los extractos, se han caracterizado químicamente para evaluar si la modificación en el proceso de extracción había dado lugar a extractos con un contenido en compuestos mayoritarios diferente. Por un lado, se ha realizado el análisis de los extractos por HPLC con detector ultravioleta obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 10, cuyo cromatograma correspondiente se puede observar en la figura 38.

Tabla 10: Concentración de ácido carnósico y carnosol en los extractos obtenidos por SFE, determinado empleando el análisis por HPLC.

Extracto	ácido carnósico (mg/g extracto)	carnosol
Romero A	180	16
Romero B	256	38

El extracto denominado romero A contenía, como ya se ha indicado anteriormente, concentraciones expresadas en mg/g de extracto de 180 mg/g de ácido carnósico y 16 mg/g de carnosol, mientras que el romero B presentaba concentraciones de 256 mg/g de ácido carnósico y 38 mg/g de carnosol.

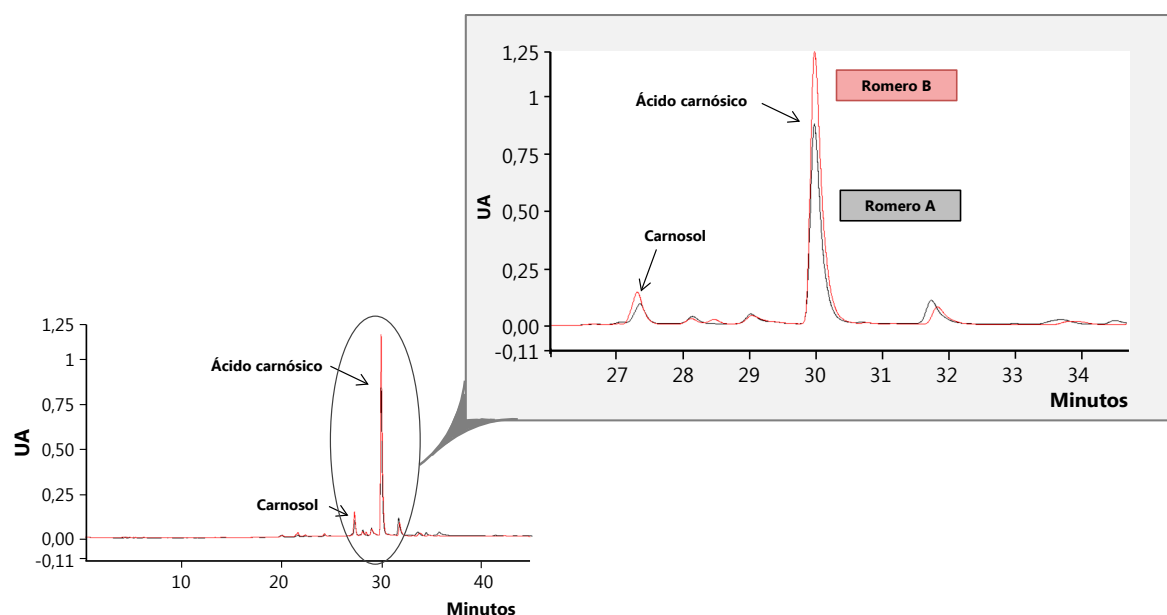


Figura 38: Cromatogramas obtenidos por HPLC de las muestras de romero A y B.

Por lo tanto, el empleo de un 5% de etanol en el procedimiento de extracción con CO₂ permite la obtención de un extracto 1,4 veces superior en ácido carnósico y duplica la cantidad de carnosol. Hay que poner de manifiesto que estudios realizados por otros miembros del Grupo de Investigación en el que se ha desarrollado este trabajo indican que la utilización de un porcentaje superior de etanol proporciona extractos con un mayor número de compuestos, pero con una concentración de ácido carnósico menor (Vicente y col., 2012b; Vicente y col., 2013).

Asimismo, la composición del aceite esencial de ambos extractos ha sido analizada por GC-MS cuyos resultados aparecen indicados en la tabla 11. Al introducir etanol en el procedimiento de extracción, la abundancia relativa de los compuestos mayoritarios del aceite esencial ha variado poco, siendo destacable únicamente la menor concentración de 1,8-cineol y la aparición de la verbenona, que no se había detectado en el romero A.

Tabla 11: Abundancia relativa en porcentaje de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de los extractos, determinado con GC-MS.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Romero A	Romero B
6,28	α -Pino	0,58	1,32
6,85	Canfeno	0,26	0,72
8,3	1-Octen-3-ol	0,04	-
8,64	3-Octanone	-	0,63
8,84	β - Myrcene	-	0,76
8,85	β -Pino	0,11	-
10,54	m-Cimeno	0,75	1,76
10,75	Limoneno	0,37	1,58
10,88	1,8-Cineol	54,51	50,04
14,91	Linalol	1,06	1,38
17,25	Alcanfor	21,23	22,07
18,5	Borneol	4,86	4,73
18,7	β -Terpineol	-	0,89
19,29	1-Terpineno-4-ol	1,21	1,32
19,85	p-Cimen-8-ol	0,11	-
20,1	α -Terpineol	5,4	4,93
21,12	Verbenona	-	4,47
25,6	Acetato de bornilo	0,08	-
31,40	Copaeno	0,49	-
34,50	Cariofileno	6,81	3,39
37,20	α -Cariofileno	0,71	-
43,5	δ -Cadineno	1,18	-
48,48	Oxido de cariofileno	0,25	-

Por tanto, mediante la incorporación de un 5% de etanol como co-solvente, se ha obtenido un extracto de romero con concentraciones superiores en ácido carnósico y en carnosol y una composición similar del aceite esencial.

3.3.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria

Tras la caracterización química de los extractos A y B de romero, se ha determinado su actividad antiinflamatoria en paralelo. Como es habitual, se ha estudiado la toxicidad del romero B, determinándose 5 µg/mL como la mayor concentración no citotóxica. A continuación se ha medido, por un lado, la secreción al medio de cultivo de los macrófagos de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la antiinflamatoria IL-10 y, por otro, su expresión génica, estudiando asimismo, la expresión génica del gen que codifica la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), responsable de la síntesis de prostaglandina E₂, un mediador que facilita la progresión de la inflamación (Posadas y col., 2000). La síntesis de COX-2 se activa en una situación de inflamación inducida por la secreción de citoquinas con actividad proinflamatoria como IL-1 β , TNF- α o IL-6, factores de crecimiento como VEGF u otros compuestos como NO (Morita, 2002).

3.3.2.1 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LPS

Los resultados de secreción de citoquinas obtenidos tras el tratamiento durante 24 horas con los extractos supercríticos de romero, A y B, se muestran en la figura 39. De ambos extractos se han ensayado concentraciones no tóxicas para las células, 2 y 5 µg/mL. Asimismo, se han incluido los resultados derivados del efecto del fármaco antiinflamatorio indometacina, en concentraciones de 5 µg/mL.

De este modo, la adición de 5 µg/mL de romero A ha disminuido la secreción de TNF- α algo menos de un 20%; para concentraciones similares del romero B la inhibición alcanza un 80% con respecto al control positivo, dato similar al obtenido con la indometacina. La incorporación de 2 µg/mL del extracto de romero B inhibe en un 40% la secreción de TNF- α .

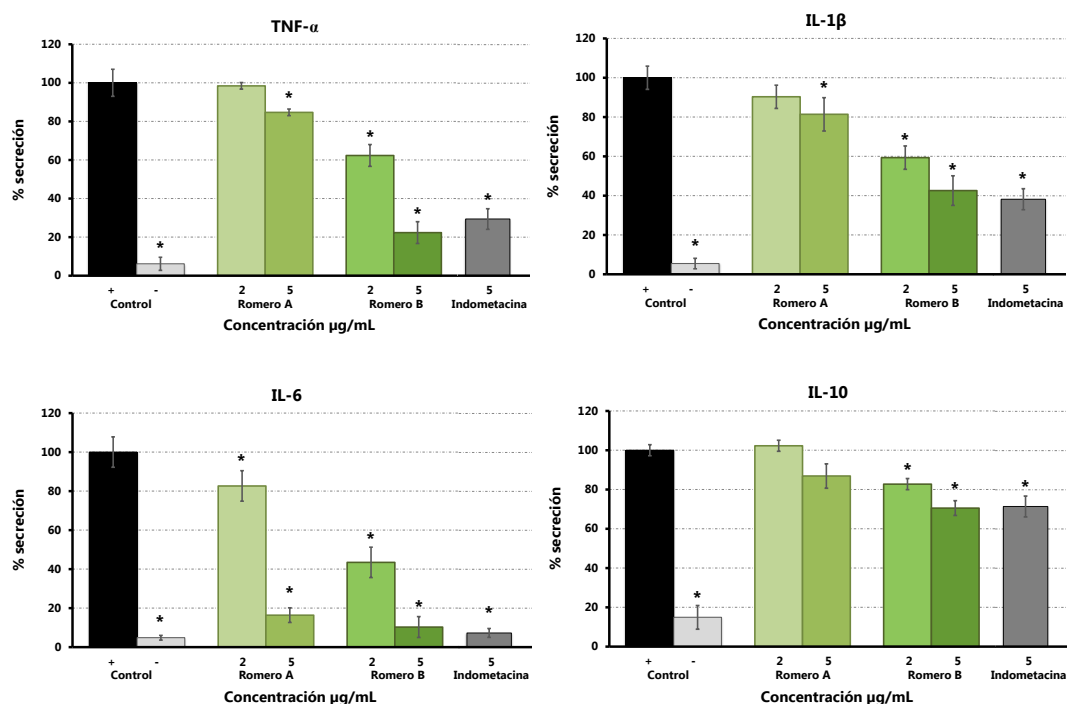


Figura 39: Secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-10, en macrófagos activados con LPS tras 24 horas de tratamiento en presencia de los extractos supercríticos de romero. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Asimismo, la secreción de IL-1 β también se reduce tras la incorporación de los extractos supercríticos de romero. De nuevo, la mayor actividad corresponde al extracto de romero B, que disminuye la secreción en un 60%, mientras que la misma concentración del romero A (5 μ g/mL) solo consigue reducirla en un 20%. Al igual que sucedía con la secreción de TNF- α , concentraciones de 5 μ g/mL tanto de romero B como de indometacina disminuyen la secreción de IL-1 β de forma similar, alcanzando valores de un 60%.

La incorporación de romero A y B en el medio de cultivo de las células ha provocado un descenso en la secreción de IL-6 hasta valores cercanos a los obtenidos para la situación basal de no estimulación de las células. En este caso, 5 μ g/mL de ambos extractos han tenido un efecto similar a la indometacina, aunque 2 μ g/mL de romero B han provocado una disminución del 60% en esta citoquina, porcentaje que disminuye al 20% para el romero A.

En el caso de la citoquina antiinflamatoria IL-10, 5 µg/mL de romero A no han disminuido su secreción significativamente, observándose un mayor efecto en la inhibición con el romero B y la indometacina con porcentajes de inhibición del 30%.

En la figura 40 se muestran los resultados derivados de la determinación de la expresión génica tras 24 horas de incubación.

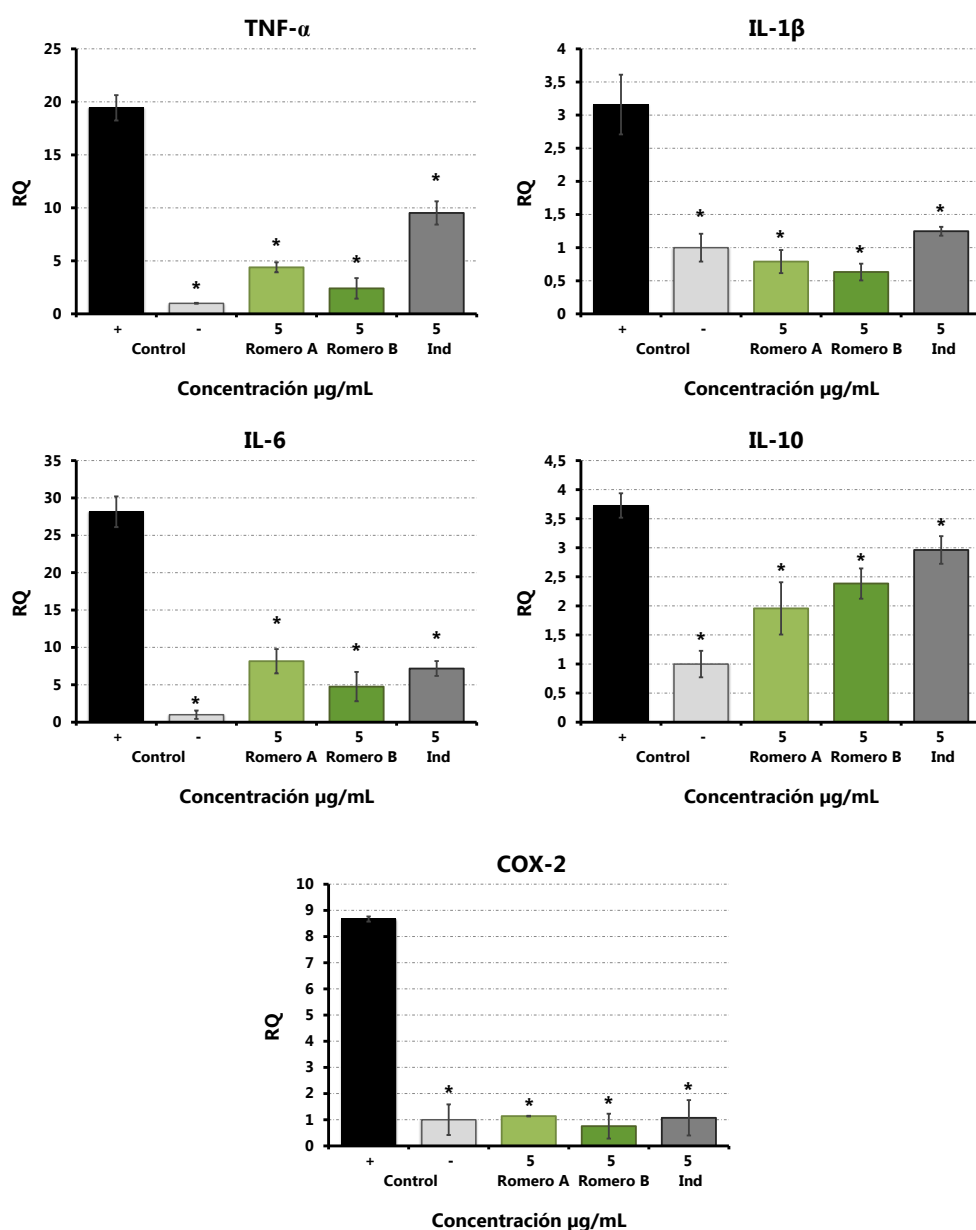


Figura 40: Expresión génica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y COX-2 en macrófagos activados con LPS tras 24 horas de tratamiento en presencia de los extractos supercríticos de romero.* $p < 0,05$, con respecto al control +.

Como cabía esperar tras los resultados de secreción de citoquinas, el tratamiento con ambos extractos ha inhibido la expresión génica de todos los genes estudiados hasta valores próximos a la situación basal, mostrando el romero B unos valores de inhibición ligeramente superiores a los del romero A. Además de disminuir la expresión de todas las citoquinas que señalizan el estado inflamatorio, los extractos también han ejercido su efecto a otros niveles del proceso, como en la progresión de la inflamación, ya que han inhibido hasta niveles basales la expresión génica de COX-2, enzima inducible que únicamente actúa en situación de inflamación y cuya expresión se ha incrementado en gran medida tras la incorporación de LPS. En este sentido, está descrito un incremento de la expresión de COX-2 en macrófagos humanos procedentes de la línea celular THP-1, tras la incorporación en el medio de cultivo de LPS (Liu y col., 2010). Por su parte, Wang y col. (2008) refieren un incremento en la expresión génica de COX-2 en un modelo de inflamación similar al empleado, macrófagos humanos activados con LPS, que se revierte con la incorporación en el medio de cultivo de un compuesto con actividad antiinflamatoria, la cianidina-3-o- β -glucósido.

Estos resultados indican que ambos extractos supercríticos de romero poseen una elevada actividad antiinflamatoria, ya que 5 μ g/mL son capaces de disminuir la liberación y expresión de citoquinas proinflamatorias y la expresión de la enzima COX-2, destacando el extracto obtenido en presencia de un 5% de etanol. Puesto que la mayor diferencia existente entre ambos extractos es su contenido en ácido carnósico y carnosol, se puede concluir que al aumentar la cantidad de estos compuestos en el extracto, lo hace su actividad antiinflamatoria.

En este sentido, Kuo y col. (2011) estudiaron la actividad antiinflamatoria de un extracto supercrítico de romero, con un contenido de 107,7 mg/g de extracto de ácido carnósico y 30 mg/g de extracto de carnosol, indicando que concentraciones de 12,5 μ g/mL de los extractos eran capaces de disminuir la liberación de TNF- α en un modelo de células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Además, esta concentración del extracto también era capaz de suprimir la expresión de iNOS y COX-2. Estos datos apoyan la tesis de que el aumento de concentración de ácido carnósico y carnosol, favorece su actividad antiinflamatoria; de este modo, en nuestro caso, donde los extractos presentan una cantidad superior de ácido carnósico y carnosol (sobre todo en el caso del romero B),

concentraciones de 5 µg/mL de ambos extractos son capaces de inhibir la liberación y expresión de TNF-α y la expresión de COX-2.

3.3.2.2 Modelo de inflamación utilizando macrófagos activados con LDLox

La incorporación de los extractos supercríticos de romero A y B ha provocado un descenso en la secreción de las citoquinas proinflamatorias medidas en el modelo de inflamación dependiente de oxidación, cuyos resultados se muestran en la figura 41.

La secreción de TNF-α ha descendido hasta niveles basales con la incorporación de 5 µg/mL de ambos tipos de romero, aunque 2 µg/mL del extracto de romero B también han sido suficientes para alcanzar los niveles basales de esta citoquina.

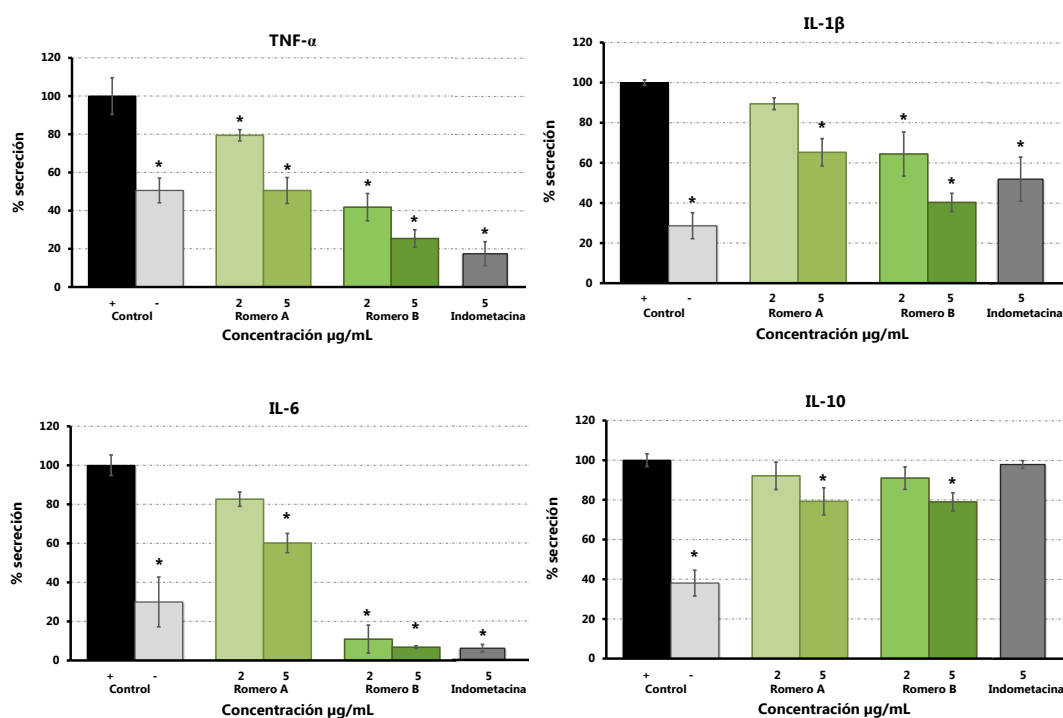


Figura 41: Secreción de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10 en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento en presencia de los extractos supercríticos de romero. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

En el caso de IL-1β, los dos tipos de romero disminuyen su secreción, aunque la mayor disminución ocurre con el romero B, llegando casi a los valores basales. Asimismo,

la secreción de IL-6 solamente ha alcanzado su nivel basal con el romero B, valores que han sido cercanos a los obtenidos para la indometacina.

El nivel de secreción de IL-10 se ha inhibido con la incorporación de romero A hasta en un 20%; un comportamiento similar se aprecia para el romero B. Finalmente, la indometacina no ha modificado la secreción de esta interleuquina tras su incorporación en el medio de cultivo.

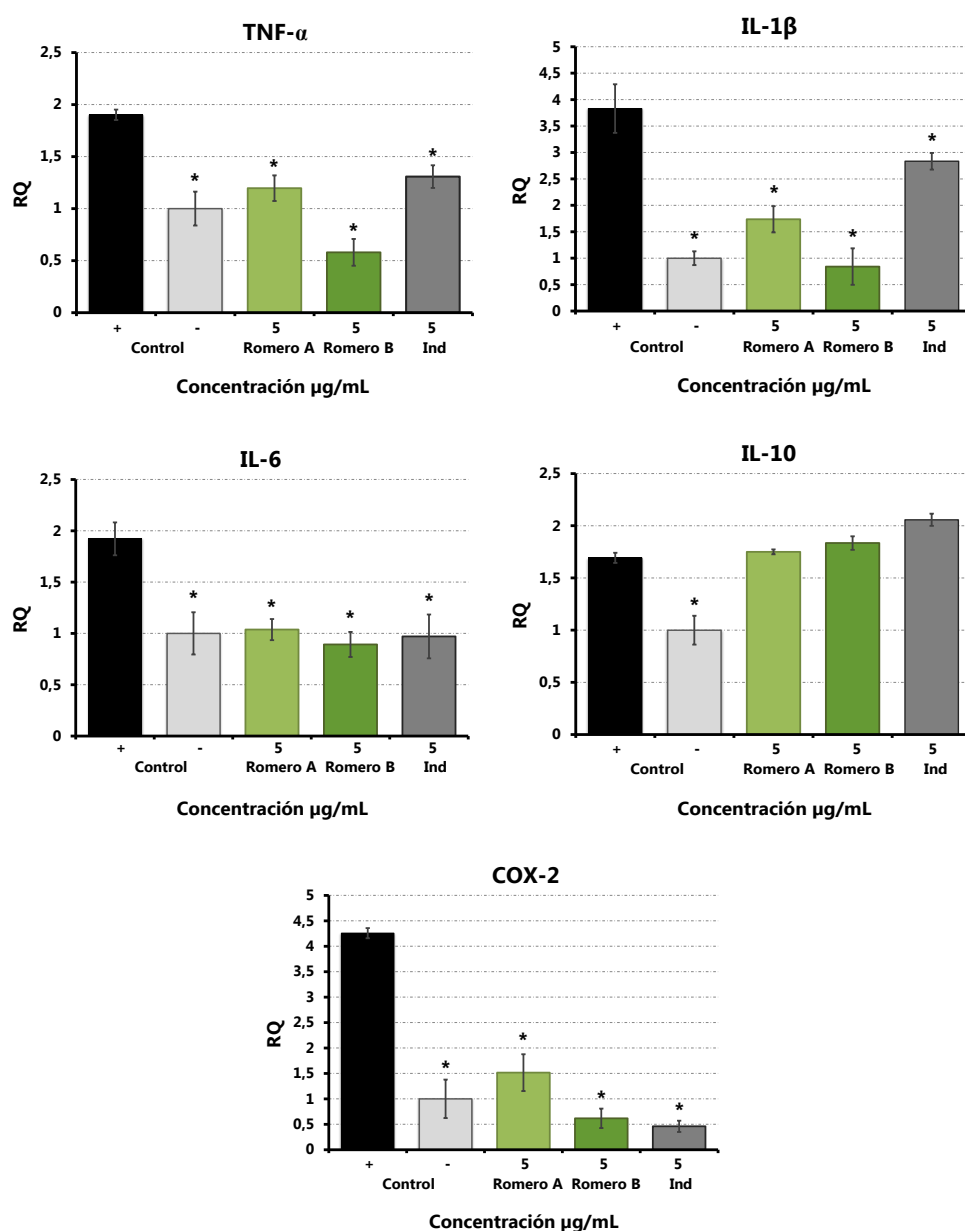


Figura 42: Expresión génica de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$ y $COX-2$ en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento en presencia de los extractos supercríticos de romero. * $p < 0.05$, con respecto al control +.

En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos derivados de la medida de la expresión génica. El tratamiento con los extractos de romero ha disminuido la expresión de todos los genes, salvo el de la IL-10. El extracto de romero B minimiza la expresión génica de IL-1 β y TNF- α por debajo de los niveles obtenidos con el romero A, destacando la capacidad del romero B para disminuir la expresión de TNF- α hasta valores inferiores a los basales. Con respecto a IL-6 ambos extractos favorecen una reducción de la expresión hasta valores basales. Para IL-10 no se han encontrado diferencias significativas entre los tratamientos con el control positivo. En el caso de la enzima COX-2, su expresión desciende hasta los valores basales para ambos extractos, siendo su expresión inferior a la del control negativo.

Al igual que el modelo de inflamación que utiliza LPS, el extracto supercrítico de romero más activo ha sido el obtenido tras el empleo de etanol como co-solvente en el proceso de extracción. Por tanto, se establece también en este modelo una relación entre el contenido en ácido carnósico y carnosol de los extractos y su actividad antiinflamatoria.

3.3.3 Relación del contenido en ácido carnósico y carnosol con la actividad antiinflamatoria de los extractos

Teniendo en cuenta que el enriquecimiento del extracto de romero B en ácido carnósico y carnosol ha permitido aumentar la actividad antiinflamatoria del extracto original (romero A), se han comparado los resultados obtenidos con la utilización de las mismas concentraciones de patrones puros de ácido carnósico y carnosol (figuras 43 y 44). Como puede observarse en el modelo de inflamación que utiliza LPS (figura 43), concentraciones de 2 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de romero B disminuyen la liberación de TNF- α en mayor medida que los patrones de ácido carnósico y carnosol. En el caso de la IL-1 β , IL-6 e IL-10, valores de 2 $\mu\text{g/mL}$ del romero B presentan una inhibición de la secreción de estas citoquinas parecida a la del patrón del carnosol y superior a la del ácido carnósico.

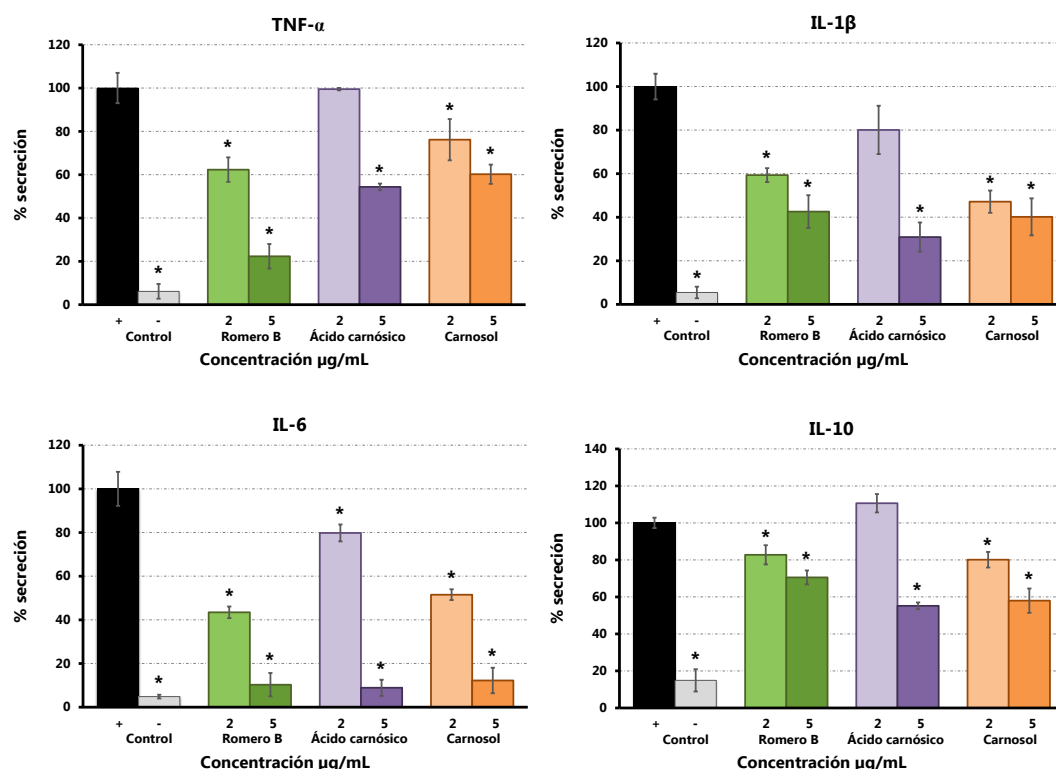


Figura 43: Secreción de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e IL-10 en macrófagos activados con LPS tras 24 horas de tratamiento, en presencia del romero B, ácido carnósico y carnosol. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

De forma similar, al activar los macrófagos con LDLox e incorporar el extracto de romero B, su actividad es muy similar a la de los patrones (figura 44). En este caso, 2 $\mu\text{g/mL}$ de patrones y extracto inhiben la secreción hasta valores cercanos al control negativo, revertiendo así la situación patológica de inflamación para la secreción de las citoquinas $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 .

Si tenemos en cuenta que 2 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de romero B contienen 0,52 $\mu\text{g/mL}$ de ácido carnósico y 0,076 $\mu\text{g/mL}$ de carnosol y que la inhibición de la liberación de las citoquinas en ambos modelos arroja valores bastante similares a los patrones, estos resultados indicarían que, la presencia de otros compuestos que también influirían, aunque en menor medida, en la actividad antiinflamatoria de los extractos. En este sentido, Kuo y col. (2011) indican la existencia de posibles interacciones sinérgicas entre el ácido carnósico y otros compuestos presentes en el extracto supercrítico de romero relacionadas con una mayor actividad antiinflamatoria.

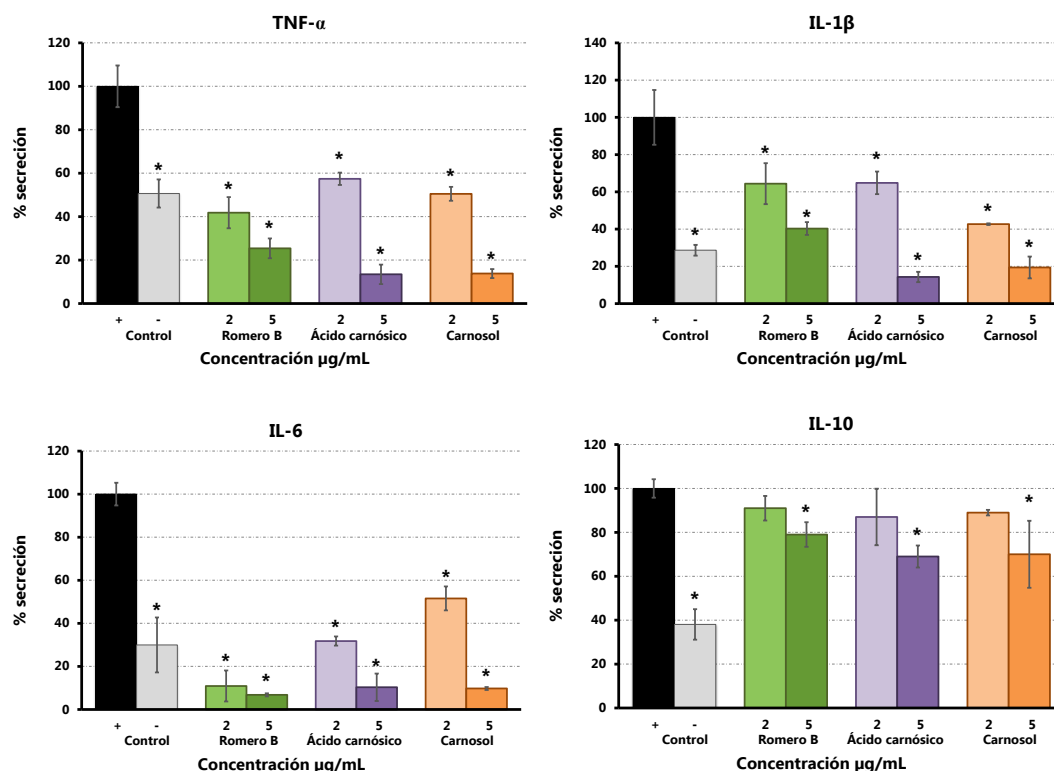


Figura 44: Secreción de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y $IL-10$ en macrófagos activados con LDLox tras 24 horas de tratamiento, en presencia del romero B, ácido carnósico y carnosol. * $p < 0,05$, con respecto al control +.

Considerando nuestro extracto, estos componentes podrían ser el 1,8-cineol y el alcanfor, presentes en una elevada cantidad y con demostrada actividad antiinflamatoria; de hecho, según se ha descrito en secciones anteriores, estos compuestos presentan actividad antiinflamatoria en modelos similares a los empleados, reduciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias o NO (Santos y Rao, 2000; Ehrnhöfer-Ressler y col., 2013).

3.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto supercrítico de romero

Una vez determinado que el extracto más activo, cuando se ha aplicado directamente a los macrófagos, se corresponde con el romero obtenido por SFE y empleo de etanol como co-solvente, se estimó importante valorar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos del extracto y su efecto en la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible.

En un primer paso, el extracto de romero se ha añadido sobre una monocapa de células Caco-2, que se utilizan como modelo para simular la barrera de enterocitos del intestino y constituyen un modelo de absorción utilizado de forma habitual por su versatilidad y funcionalidad (Sambuy y col., 2005). Posteriormente la fracción biodisponible se adiciona sobre macrófagos estimulados con LPS para estudiar sus propiedades antiinflamatorias. Este modelo se conoce como la técnica del co-cultivo y ha sido ampliamente ensayado (Manabe y col., 2003; Satsu y col., 2006; Takisawa y col., 2009).

Igualmente, se ha determinado la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible de una mezcla de patrones de ácido carnósico y carnosol, ya que de los resultados inferidos en la sección anterior se deduce que la actividad antiinflamatoria del extracto de romero se relaciona en gran medida, aunque no totalmente, con el contenido en estos compuestos.

La comparación de la actividad antiinflamatoria de las dos fracciones biodisponibles (extracto y mezcla de patrones) permitirá, de un lado, conocer la biodisponibilidad del ácido carnósico y del carnosol y, de otro, obtener datos sobre la biodisponibilidad de otros compuestos que en la sección anterior se relacionaron con la mayor actividad antiinflamatoria del extracto, frente a la mezcla de patrones.

3.4.1 Ensayo de absorción *in vitro*

Los ensayos de absorción del extracto de romero B se han realizado empleando enterocitos diferenciados a partir de células Caco-2 en placas Transwell®. Los periodos de incubación de los enterocitos con el extracto de romero han sido de 2, 4, 8 y 12 horas, con el propósito de valorar si el incremento en el tiempo de incubación mejoraba la

biodisponibilidad del extracto. Dicha biodisponibilidad se ha medido mediante la determinación del ácido carnósico y carnosol presentes en la zona basolateral de las placas Transwell®. Se ha ensayado una concentración de 20 µg/mL, determinada como la máxima concentración no tóxica para la línea celular Caco-2 durante un tiempo de incubación de 12 horas (datos no mostrados).

Paralelamente se ha llevado a cabo el mismo estudio empleando como muestra una mezcla de los patrones de ácido carnósico y carnosol, denominada mezcla de patrones, en proporciones similares a las presentadas en el extracto; por tanto, se incorporan 20 µg/mL de una mezcla que contenía un 25,6% de ácido carnósico y un 3,8% de carnosol.

Tras los distintos periodos de incubación, se han recogido las muestras procedentes de la zona apical (fracción no absorbida), de la zona basolateral (fracción biodisponible) y del interior de las células (fracción bioaccesible). A continuación, se ha realizado un proceso de liofilización de las muestras y se ha determinado la cantidad de ácido carnósico y carnosol presente en las mismas, dada su relación con la actividad antiinflamatoria del extracto. Para ello se ha empleado un equipo de UHPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS).

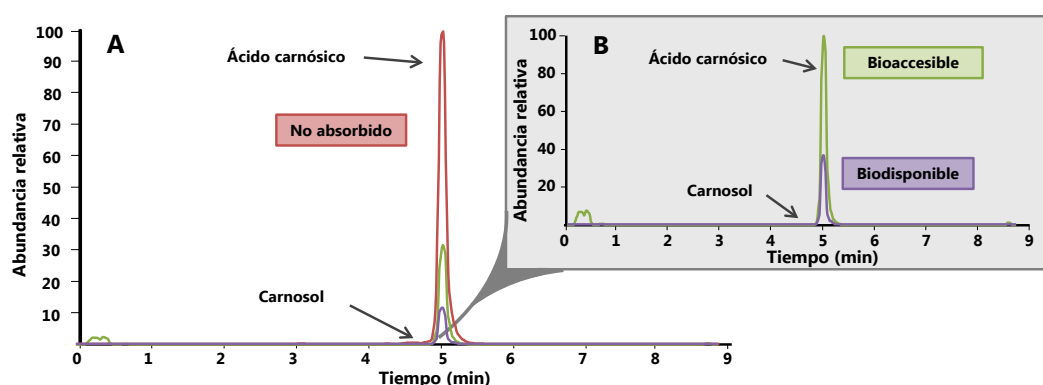


Figura 45: Cromatogramas obtenidos por UHPLC tras el proceso de absorción in vitro del extracto de romero, empleando un filtro para el ácido carnósico y el carnosol de 331 m/z – (286,975-287,075). Los resultados aparecen normalizados en A con respecto a un valor de intensidad de $1,72 \times 10^7$ y en B con respecto a $5,88 \times 10^6$.

En la figura 45 se muestra un ejemplo de los cromatogramas superpuestos de las tres fracciones recuperadas, para el periodo de incubación con extracto de romero más

largo (12 horas). Los cromatogramas mostrados se obtienen empleando un filtro para el ácido carnósico, con un tiempo de retención de 5,1 minutos y para el carnosol, con un tiempo de retención de 4,6 minutos.

Los porcentajes de ácido carnósico detectados en las zonas apical, basolateral e interior de los enterocitos tras 2, 4, 8 y 12 horas de incubación con el extracto de romero, se muestran en la figura 46. De su estudio se puede observar que, tras 2 horas de incubación, se produce un descenso del ácido carnósico en la zona apical (fracción no absorbida) de entre un 25-30% respecto a la cantidad añadida, valor que se corresponde con el detectado en el interior de las células (fracción bioaccesible).

Al incrementar el tiempo de tratamiento a 4 horas, la cantidad de ácido carnósico no absorbida va disminuyendo en contraposición con la detectada en los enterocitos. A las 8 horas de tratamiento se detecta por primera vez un 12% de ácido carnósico en la zona basolateral (fracción biodisponible), valor que aumenta con el tiempo de tratamiento, hasta llegar a un 25% a las 12 horas. Hay que señalar que este aumento de concentración de ácido carnósico biodisponible, al pasar de 8 a 12 horas de tratamiento, parece provenir del interior de los enterocitos ya que la proporción no absorbida no se ha modificado en este intervalo de tiempo.

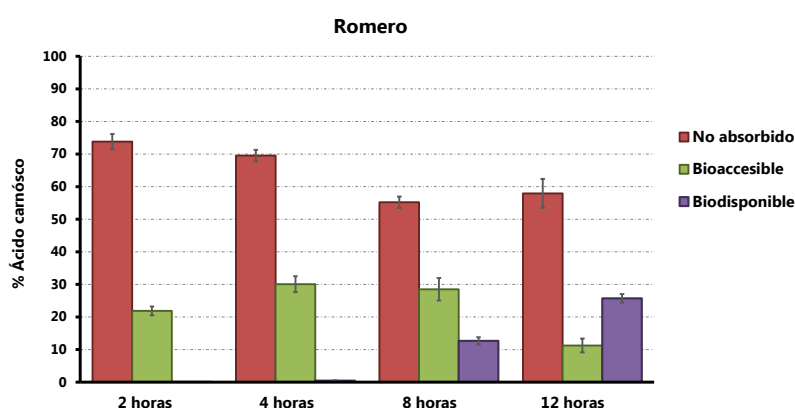


Figura 46: Contenido en porcentaje de ácido carnósico, con respecto al adicionado en la zona apical, tras los distintos periodos de incubación de los ensayos de absorción del extracto de romero.

Respecto al carnosol (figura 47), se puede indicar que hasta las 4 horas de ensayo, no se detecta en el interior de los enterocitos. A las 8 horas el porcentaje es cercano al 8%

del aplicado, y a las 12 horas dicha cantidad aumenta hasta un 20%. La concentración de carnosol biodisponible a las 12 horas es muy pequeña, en torno a un 3%, siendo este periodo de incubación el primero en el que se detecta.

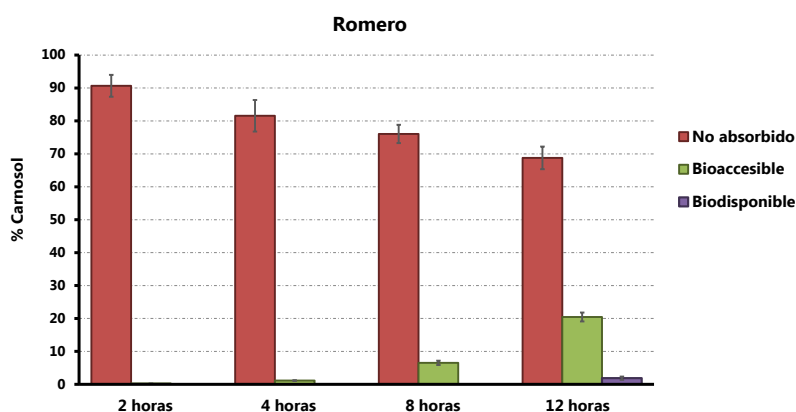


Figura 47: Contenido en porcentaje de carnosol con respecto al adicionado en la zona apical, tras los distintos periodos de incubación de los ensayos de absorción del extracto de romero.

En las figuras 48 y 49 se muestran los resultados derivados del ensayo de absorción tras la incorporación de la mezcla de ácido carnósico y carnosol, en concentraciones similares a las detectadas en la muestra de extracto de romero B. La absorción de ácido carnósico y carnosol ha seguido el mismo patrón comentado con anterioridad para la muestra del extracto de romero. Como puede observarse, la absorción de ácido carnósico es más rápida, llegando de nuevo casi a un 20% la fracción bioaccesible, en tan solo 2 horas de incubación. Con el incremento del tiempo de incubación también aumenta la fracción bioaccesible del ácido carnósico, cuyo máximo se ha encontrado a las 4 horas, con más de un 30% de la cantidad inicial. A partir de las 8 horas comienza a encontrarse ácido carnósico en la fracción biodisponible, incrementándose hasta un 20% de la cantidad inicial, tras 12 horas de tratamiento. Respecto al carnosol, solo se ha encontrado en la zona basolateral tras 12 horas de tratamiento y en una cantidad inferior también al 3%.

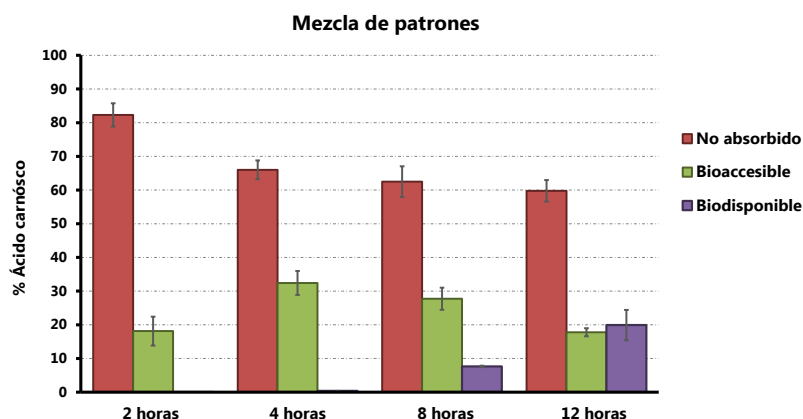


Figura 48: Contenido en porcentaje de ácido carnósico con respecto al adicionado en la zona apical, tras los distintos periodos de incubación de los ensayos de absorción con la mezcla de patrones.

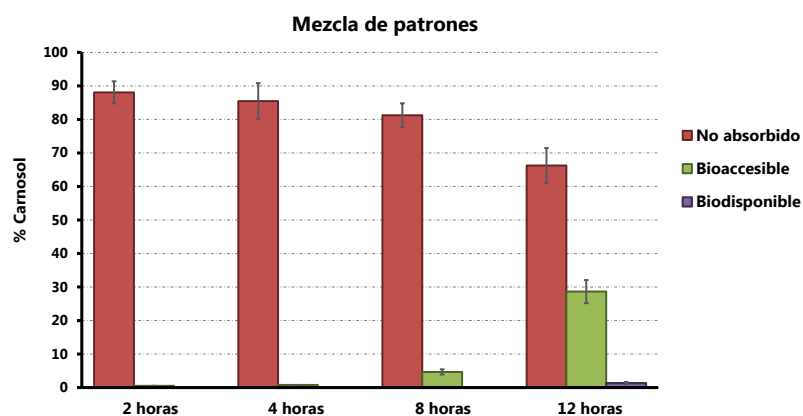


Figura 49: Contenido en porcentaje de carnosol con respecto al adicionado en la zona apical, tras los distintos periodos de incubación de los ensayos de absorción con la mezcla de patrones.

Tras estos ensayos se puede observar que, tanto el ácido carnósico como el carnosol son compuestos que, en una cierta cantidad, pueden atravesar la barrera intestinal y por tanto encontrarse biodisponibles. La absorción del ácido carnósico presente en las dos muestras ensayadas, ha sido más rápida que la del carnosol, encontrándose en tiempos de incubación más cortos en las fracciones bioaccesible y biodisponible. Según los resultados obtenidos, no se han observado diferencias entre la absorción del ácido carnósico y del carnosol, bien cuando están formando parte de la mezcla de patrones, o como parte del extracto supercrítico.

En estudios previos realizados en el Grupo de Investigación en un modelo de absorción similar, no se había detectado la presencia de ácido carnósico ni carnosol en la fracción biodisponible, tras la aplicación de un extracto supercrítico de romero sometido a un proceso de digestión *in vitro* (Soler-Rivas y col., 2010). Sin embargo, se encontró actividad antioxidante en la fracción biodisponible, lo que fue atribuido a los metabolitos que se forman tras el paso por la barrera intestinal. Contrariamente, en nuestro estudio sí se ha detectado la presencia de carnosol y ácido carnósico en la fracción biodisponible del extracto de romero, posiblemente por una mayor sensibilidad de la técnica analítica empleada, la cromatografía de líquidos de ultra alta presión con un detector de masas en el que se ha fijado un filtro para la búsqueda de ácido carnósico y carnosol. Asimismo, debe considerarse que, en este caso, la muestra no se ha sometido a un proceso de digestión *in vitro* y que el ensayo se ha prolongado hasta las 12 horas.

Otros estudios sobre la biodisponibilidad del ácido carnósico utilizando modelos animales, indican la presencia de ácido carnósico en muestras de sangre de ratas tras administración directa en el estómago de una solución de 64 mg/kg de ácido carnósico (Doolaege y col., 2011). Estos autores indicaron que la absorción gastrointestinal del ácido carnósico es lenta, con un pico máximo tras más de 125 minutos de tratamiento y una biodisponibilidad de un 40%; además, en heces se encuentra únicamente un 15% de la cantidad incorporada inicialmente, detectándose trazas en muestras de músculo e hígado. Estos resultados son similares a los encontrados por Yan y col. (2009) tras la administración intragástrica de 90 mg/kg de ácido carnósico en ratas, estos autores refieren una lenta absorción gastrointestinal, lo que supone un mayor tiempo de retención y una ralentización en la eliminación del compuesto del plasma. El estudio indica, además, que la biodisponibilidad del ácido carnósico es elevada, un 65% de la cantidad administrada inicialmente.

La biodisponibilidad *in vivo* del ácido carnósico presente en un extracto supercrítico de romero también ha sido estudiada, según referencias encontradas en la bibliografía. Concretamente Krause y col (2000) cuantificaron la cantidad de ácido carnósico depositada en la yema de huevo de gallinas con una dieta suplementada en extracto supercrítico de romero. Estos autores encontraron que tras 12 días de alimentación con 0,28% de extracto, la yema de huevo contenía 38 ng/g de ácido carnósico, estableciéndose una transferencia a la yema del 0,0025% del ácido carnósico administrado.

Por tanto, estos datos bibliográficos apoyan los resultados obtenidos respecto a la biodisponibilidad del ácido carnósico presente en el extracto supercrítico de romero. El ácido carnósico puede, atravesar así, en un importante porcentaje, la barrera intestinal y mantener sus actividades biológicas, entre ellas, su posible actividad antiinflamatoria, estudiada en el siguiente epígrafe.

3.4.2 Actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible del extracto de romero

Como etapa previa a la determinación de la actividad antiinflamatoria, la fracción biodisponible de cada una de las muestras, procedentes de la etapa de absorción intestinal *in vitro*, se ha liofilizado y reconstituido con el medio de cultivo requerido durante el crecimiento de los macrófagos. Posteriormente, estas muestras reconstituidas, se adicionan al medio de cultivo de macrófagos activados con 0,05 µg/mL de LPS, durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, se ha determinado la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 en el medio de cultivo de los macrófagos. De forma paralela, se ha determinado la actividad antiinflamatoria de la fracción biodisponible de la mezcla de patrones (ácido carnósico y carnosol), utilizando el procedimiento descrito para el extracto de romero.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 50, donde se representa la concentración, en pg/mL, de las citoquinas secretadas de la fracción biodisponible del extracto de romero, seguida de la fracción biodisponible de la denominada mezcla de patrones, para cada uno de los periodos de incubación.

Puesta en contacto con los macrófagos activados, la fracción biodisponible obtenida tras 2 horas de duración de los ensayos de absorción con células Caco-2, no muestra ningún efecto en la secreción de las citoquinas estudiadas, siendo los niveles de secreción, en todos los casos, similares al control positivo. Este resultado está en concordancia con los análisis efectuados a esta fracción biodisponible en el apartado anterior, ya que a las 2 horas no se ha detectado presencia de ácido carnósico ni de carnosol.

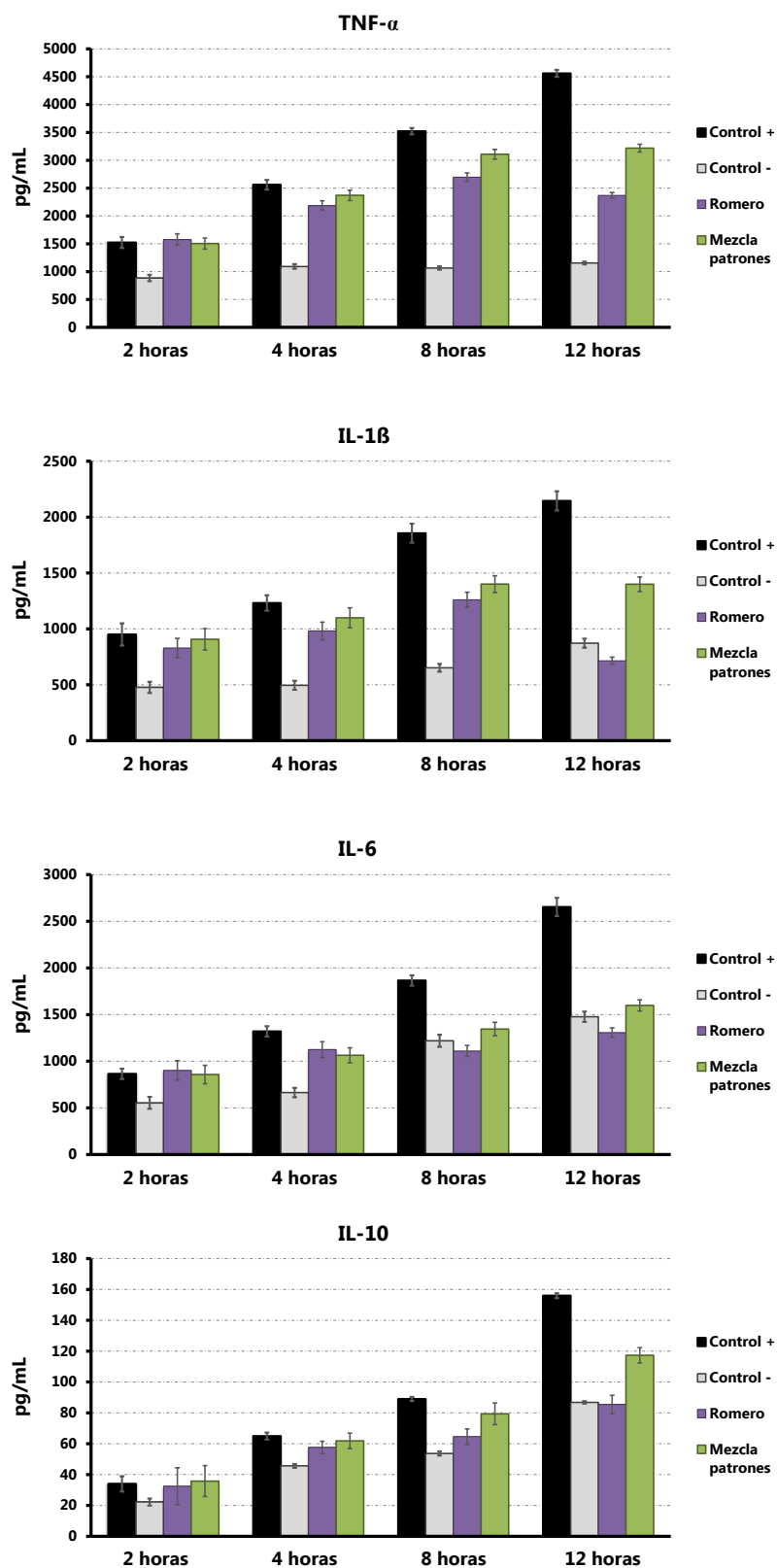


Figura 50: Secreción de $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ e $IL-10$ tras el tratamiento con la fracción biodisponible del extracto de romero y de la mezcla de patrones durante 2, 4, 8 y 12 horas.

Al incorporar la fracción biodisponible tras 4 horas de ensayo, se observa una ligera disminución en la liberación de todas las citoquinas, comparadas con el control positivo. Sin embargo, la fracción biodisponible obtenida a las 8 horas de ensayo de absorción ocasiona una disminución importante en la liberación de todas las citoquinas secretadas, sobre todo en el caso de la IL-6, donde se alcanzan los niveles basales.

Por último, la fracción obtenida tras 12 horas de ensayo muestra una menor liberación de todas las citoquinas, si se compara con los valores del control positivo. La liberación de TNF- α se inhibe en torno a un 50%, con la fracción biodisponible del extracto de romero, mientras que la de IL-1 β , IL-6 e IL-10 vuelve a los niveles basales.

La disminución en la liberación de citoquinas observada en los ensayos determinados con las fracciones obtenidas a 8 y 12 horas, parece estar muy relacionada con el aumento de carnosol y, sobre todo, de ácido carnósico en la fracción biodisponible.

Sin embargo, en los ensayos realizados a partir de la fracción biodisponible procedente del estudio de absorción con la mezcla de patrones de ácido carnósico y carnosol, fundamentalmente tras 8 y 12 horas, se puede observar que la liberación de citoquinas es superior para la mezcla de patrones frente al extracto de romero. Así, a las 12 horas, la cantidad de TNF- α e IL-1 β liberadas es claramente superior en el caso de la mezcla de patrones, este hecho confirma los resultados obtenidos en la sección anterior, donde se indicaba que la presencia de ácido carnósico y carnosol en el extracto estaban muy relacionados con su actividad antiinflamatoria, sin olvidar la presencia de otros compuestos en el extracto que poseen actividad antiinflamatoria. Estos compuestos también serían biodisponibles y posiblemente responsables de la mayor actividad antiinflamatoria presentada por el extracto. Como se ha indicado en secciones anteriores podría tratarse de compuestos como el 1,8-cineol, el mayor constituyente del aceite esencial del extracto supercrítico de romero, con capacidad para atravesar la barrera intestinal, como demostraron Atul Bhattaram y col. (2002) y Boyle y col. (2005).

3.5 Formulación del extracto supercrítico de romero para su incorporación a alimentos de uso específico para la salud con propiedades antiinflamatorias

A lo largo de los apartados anteriores, se ha confirmado la actividad antiinflamatoria del extracto supercrítico de romero obtenido por extracción supercrítica y un 5% de etanol como co-solvente. Como se ha indicado, los compuestos mayoritarios del extracto, el ácido carnósico y el carnosol, son biodisponibles, no afectando el paso por la barrera intestinal a sus propiedades antiinflamatorias. Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados, el último objetivo de la Tesis Doctoral ha sido el diseño de un alimento de uso específico para la salud donde el extracto supercrítico de romero aporte un valor añadido, merced a sus propiedades antiinflamatorias. Para llevar a cabo este diseño, se ha seleccionado una matriz alimentaria de origen lácteo, concretamente se han empleado micelas de caseína reconocidas como estructuras naturales para la inclusión, estabilización y protección de compuestos bioactivos (Livney y Dalgleish, 2007; Chen, 2010; Livney, 2010).

Con la inclusión del extracto de romero en la matriz de las caseínas se ha tratado de estudiar si este hecho aporta una protección al extracto durante el proceso de digestión o si es capaz de mejorar su absorción por las células intestinales. Estudios previos, llevados a cabo en el Grupo de Investigación, han mostrado que el proceso de digestión puede alterar la composición del extracto de romero y dado su carácter hidrofóbico, la absorción intestinal es limitada (Soler-Rivas y col., 2010). En este sentido, otros autores han utilizado caseínas para proteger y mejorar la solubilidad de compuestos hidrofóbicos. Chen (2010) ha mostrado cómo el empleo de complejos formados por resveratrol y caseinatos mejoran la solubilidad del resveratrol, además de preservar su estabilidad en el tiempo. En otro orden, la adición de aceite de pescado durante la fabricación del queso, empleando conjugados de caseínas y proteínas de suero, minimiza la oxidación de los compuestos incluidos en las caseínas (Ye y col., 2009). De la misma manera, disminuye la degradación de la vitamina D su incorporación en micelas de caseínas (Semo y col., 2007).

Con el mismo propósito, se ha procedido a incorporar el extracto de romero en una emulsión de aceite en agua (O/W), empleando aceite de soja con Tween 20 como

surfactante. La formulación de productos alimentarios mediante el empleo de emulsiones, es un procedimiento habitual para la encapsulación de compuestos poco solubles en agua, lo que mejora su estabilidad, solubilidad y por tanto biodisponibilidad (Porter y col., 2008; Huang y col., 2010). La formación de emulsiones con polifenoles, poco solubles en agua, mejora su solubilidad y biodisponibilidad, además de algunas de sus propiedades, como su capacidad antioxidante (Almajano y col., 2008; Fang y Bhandari, 2010).

Por tanto, en esta sección se han empleado tres tipos de muestras: extracto de romero incorporado en caseínas, extracto de romero formando parte de una emulsión y extracto de romero control. En los tres casos se ha partido del extracto de romero B, con una concentración de 2 mg/mL, es decir, 0,2%. Por su parte, se han realizado estudios previos en las muestras de caseínas, dado su especial interés, destinados a evaluar descriptores como el color y el aroma. Concentraciones superiores a 2 mg/mL de romero disuelto en las caseínas, han dado lugar a mezclas con un elevado olor, e intenso color, característicos del extracto de romero. Está descrito que el tamaño de las micelas de caseínas se sitúa entre 80 y 400 nm, por tanto, se han generado nanocápsulas con el extracto incorporado (Dalglish y Corredig, 2012).

La incorporación del extracto de romero en la emulsión con aceite de soja se ha realizado, como ya se ha mencionado previamente, en un microfluidificador. Posteriormente, una vez adicionado el extracto de romero, se ha comprobado la homogeneidad y el tamaño de las gotas formadas. El diámetro medio de las gotas ha sido de un d_{43} de 0,26 μm , considerándose por tanto una nanoemulsión.

Tras la incorporación de 2 mg/mL a cada una de las tres muestras, se ha llevado a cabo una etapa de digestión *in vitro* previa al estudio de biodisponibilidad.

3.5.1 Etapa de digestión *in vitro*

La etapa de digestión *in vitro* se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito por Versantvoort y col. (2005), basado en el desarrollado previamente por Oomen y col. (2003). El interés de estos modelos radica en la composición de las disoluciones empleadas, ya que su complejidad se asemeja al comportamiento *in vivo*, asimismo se han optimizado en el tiempo para cada etapa de la digestión, una primera hora inicial para la etapa gástrica y una segunda etapa de dos horas para la duodenal. Transcurridos los

periodos de incubación, se ha determinado la cantidad de los compuestos principales, el ácido carnósico y carnosol. Para ello se ha empleado un equipo UHPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS), fijándose un filtro para la detección de ambos compuestos (331 m/z – (286,975-287,075)). Para la cuantificación porcentual de ácido carnósico y carnosol recuperados tras la digestión, respecto a la concentración de partida, se empleó una recta patrón con evaluación del área de pico (figura 51).

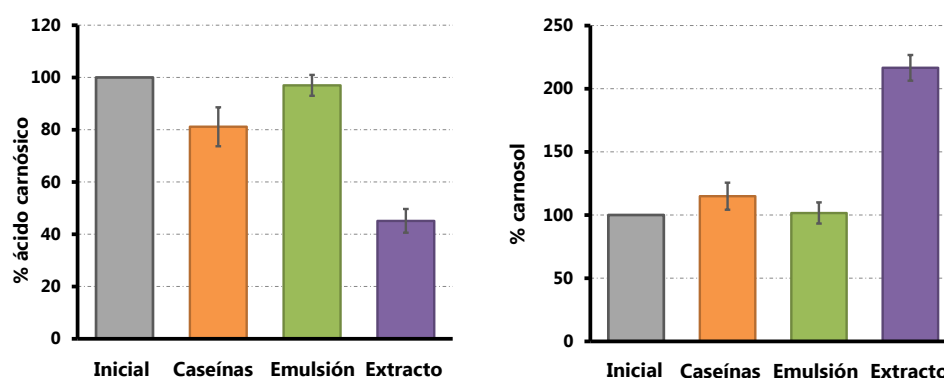


Figura 51: Contenido en porcentaje de ácido carnósico y carnosol tras la etapa de digestión con respecto a la cantidad inicial en las muestras.

Los resultados obtenidos muestran que tras el proceso de digestión, la cantidad de ácido carnósico detectado en el extracto incorporado directamente disminuye en torno a un 55%. Sin embargo, cuando el extracto está incluido en las caseínas, el porcentaje de ácido carnósico recuperado asciende a un 80%. En el caso de la muestra de extracto incorporado en la nanoemulsión con aceite de soja, no se aprecian diferencias en la concentración de ácido carnósico tras la digestión. Respecto al carnosol, los resultados indican que tras el proceso de digestión, cuando el extracto se aplica directamente, la concentración se duplica, mientras que para el extracto incorporado en las micelas, se observa un pequeño aumento, no detectándose variaciones para la nanoemulsión.

Este aumento en la cantidad de carnosol en la muestra procedente del extracto aplicado directamente podría deberse a una posible oxidación del ácido carnósico a carnosol durante el proceso de digestión. Así, Soler-Rivas y col. (2010) indicaron que el pH del duodeno podría promover la formación de grupos epoxi responsables de la transformación del ácido carnósico en carnosol.

De los resultados obtenidos puede deducirse que la incorporación del extracto en las micelas de caseína protege al ácido carnósico y al carnosol en la etapa de digestión, aunque existe una pequeña disminución en la cantidad de ácido carnósico. Esta protección puede deberse a la naturaleza hidrofóbica del extracto de romero que interaccionaría con las caseínas mediante fuerzas de *van der Waals* y puentes de hidrógeno (Livney, 2010), dando lugar a una estructura que protege al ácido carnósico de la oxidación. En este sentido, Zimet y col. (2011) han demostrado que la incorporación de ácido docosahexaenoico (DHA) en caseínas actúa como mecanismo protector frente a la oxidación. Asimismo, la encapsulación de compuestos en caseínas, como la curcumina en micelas de α_{s1} -caseínas, proporciona estabilidad y protección frente a cambios de pH (Sneharani y col., 2009).

Otro aspecto importante de la encapsulación en proteínas de la leche, es el control de la accesibilidad de las enzimas digestivas, que influye de manera fundamental en la biodisponibilidad del compuesto adicionado. La matriz formada por las proteínas de la leche da lugar, por un lado, a una barrera que actúa frente a la difusión de los compuestos que engloba y, por otro, limita el acceso de las enzimas digestivas (Livney, 2010). Recientemente se han empleado micelas de caseínas para encapsular catequinas de té verde. En este sentido, Guri y col. (2013) han demostrado que las caseínas proporcionan protección a las catequinas y que su encapsulación no modifica, en un modelo de digestión *in vitro*, su actividad antiproliferativa, confirmando así que las micelas de caseína suponen una alternativa interesante para la encapsulación de polifenoles.

Respecto a la muestra procedente de la nanoemulsión, tanto la cantidad de ácido carnósico como la de carnosol permanecen constantes tras el proceso de digestión *in vitro*. Según estos resultados, la nanoemulsión ha resultado ser el modelo más efectivo para proteger el extracto de romero. En este sentido, Sessa y col. (2011) estudiaron la estabilidad y la capacidad antioxidante, tras un proceso de digestión *in vitro*, del resveratrol en nanoemulsiones formuladas con lecitina de soja y Tween 20, poniendo de manifiesto el efecto protector de la formulación. Es interesante destacar además el tipo de estabilizante empleado, Tween 20, uno de los que menor accesibilidad permite a las lipasas pancreáticas y que, por tanto, protege en mayor medida al extracto de romero del pH del duodeno (Mun y col., 2007).

3.5.2 Etapa de absorción *in vitro*

Tras la etapa de digestión *in vitro*, se ha determinado la cantidad de ácido carnósico y carnosol en las fracciones biodisponible y bioaccesible de las muestras digeridas, empleando para ello enterocitos diferenciados a partir de células Caco-2. En el medio de cultivo de los enterocitos se ha adicionado el producto digerido atendiendo al siguiente criterio: 29,4 µL llevados a un volumen final de 500 µL (dilución 1:16), esto es, la máxima concentración determinada como no tóxica para las células (datos no mostrados). Teniendo en cuenta la cantidad de extracto de romero adicionado en el paso inicial previo a la digestión *in vitro*, de 2 mg/mL, todas las diluciones efectuadas durante el proceso de digestión, y el volumen de producto digerido incorporado en el medio de los enterocitos, la máxima cantidad de extracto de romero que se habría incorporado en los mismos, sin existir pérdidas, sería de 20 µg/mL. Según los datos obtenidos en la sección anterior, 20 µg/mL es la máxima concentración no tóxica para la monocapa de células Caco-2, y por tanto adecuada.

Para acercar el ensayo a la situación *in vivo*, los periodos de incubación en los enterocitos ensayados han sido de 2 y 4 horas, y como queda descrito previamente, los ensayos se han realizado en placas Transwell®. Tras estos periodos de incubación, se ha determinado la cantidad de ácido carnósico y carnosol presente en las muestras procedentes de la zona apical de la placa (cantidad no absorbida), el interior de las células, (cantidad bioaccesible) y la zona basolateral (cantidad biodisponible).

El análisis de las muestras se ha realizado por UHPLC con detector de masas acoplado y un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para las muestras de caseínas incorporando el filtro del ácido carnósico y carnosol, tras un periodo de incubación de 4 horas, aparece en la figura 52. En estos cromatogramas se observó la elución del ácido carnósico con un tiempo de retención de 5,1 minutos, y de carnosol a los 4,6 minutos, presentes tanto en las fracciones no absorbida, como bioaccesible y biodisponible de la muestra de caseínas. En el cromatograma B se aprecian en mayor detalle las fracciones bioaccesible y biodisponible para facilitar su visualización.

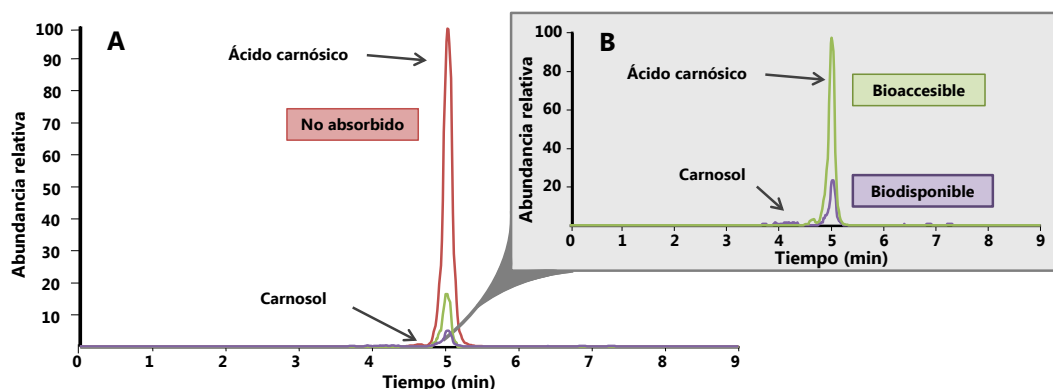


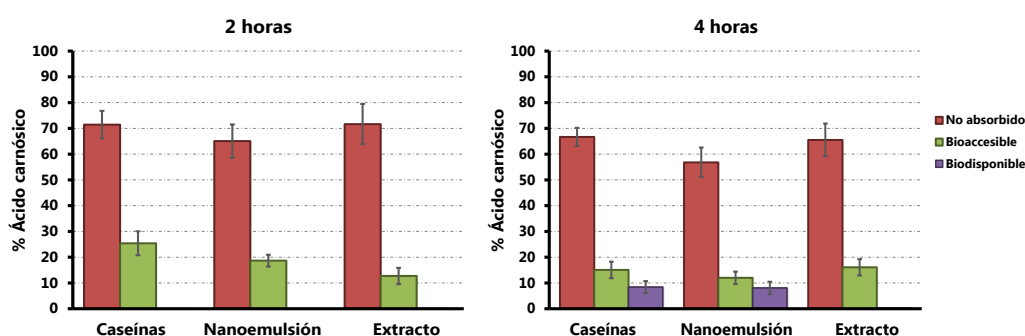
Figura 52: Cromatogramas obtenidos por UHPLC tras 4 horas de absorción del extracto de romero incorporado en caseínas, empleando un filtro para el ácido carnósico y el carnosol de 331 m/z – (286,975-287,075). Los resultados se reflejan normalizados en A a un valor de intensidad de $3,95 \times 10^7$ y en B a $5,38 \times 10^5$.

En la figura 53 se indica el porcentaje de ácido carnósico y carnosol obtenido en las células y las zonas apical y basolateral, con respecto al añadido inicialmente en la zona apical de la placa. Para tiempos de experimento de 2 horas, no se ha detectado ácido carnósico, ni carnosol en la zona basolateral, por lo que ninguno de estos compuestos estaría biodisponible. Sin embargo, cuando se analiza la concentración de ácido carnósico del interior de las células, fracción bioaccesible, se puede observar que existe un 12% en el extracto sin proteger, cantidad que se incrementa hasta un 25% en el caso de las caseínas y hasta un 20% en la muestra nanoemulsionada. En el caso del carnosol, tras 2 horas de ensayo, únicamente se aprecia una pequeña cantidad (aproximadamente un 5%) en el interior de las células de la muestra de romero libre; en el caso de las otras dos muestras no se ha detectado absorción alguna.

Cuando el tiempo del experimento aumenta a 4 horas se observa, tanto para las caseínas como para la nanoemulsión, que la cantidad de ácido carnósico no absorbido no varía significativamente, mientras que disminuye la cantidad de ácido carnósico encontrado en las células y aparece un porcentaje en la parte basolateral del pocillo, que se corresponde con la fracción biodisponible. La suma en ambos casos, de la fracción bioaccesible y biodisponible, para el ácido carnósico, a las 4 horas, se corresponde con la cantidad de este compuesto presente en las células a las 2 horas del ensayo. Estos datos indican que al incrementarse el tiempo del experimento no se produce un aumento en la cantidad de ácido carnósico presente en las células, mientras que sí aumenta el paso de

este compuesto desde las células al compartimento basolateral, es decir, se favorece su biodisponibilidad. Cuando el extracto de romero está sin proteger, la cantidad de ácido carnósico en el interior de las células, a los dos tiempos de ensayo, es similar. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con la muestra de las caseínas y la nanoemulsión, no se ha detectado ácido carnósico en la fracción biodisponible tras 4 horas de incubación. Estos resultados confirman los obtenidos en la sección anterior, donde empleando el extracto de romero directamente, eran necesarias al menos 8 horas de incubación para detectar ácido carnósico en la fracción biodisponible.

Ácido carnósico



Carnosol

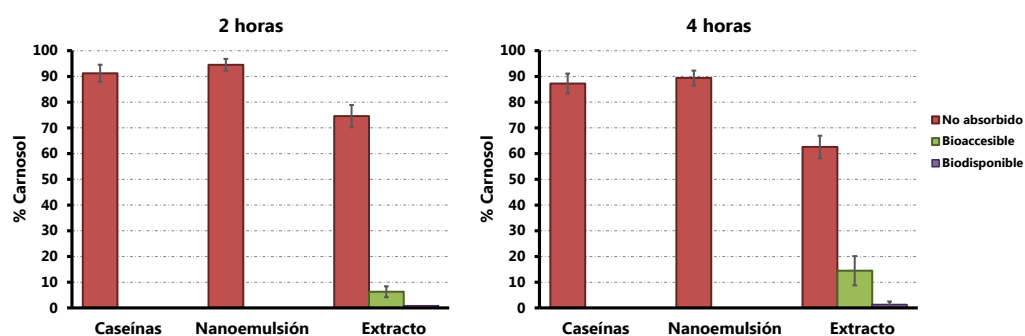


Figura 53: Contenido en porcentaje de ácido carnósico y carnosol en las fracciones no absorbida, bioaccesible y biodisponible, con respecto a lo adicionado tras la digestión *in vitro*, a diferentes tiempos de incubación para las distintas muestras.

Para tiempos de 4 horas, el carnosol solamente se detecta en el interior de las células cuando se añade el extracto solo (sobre un 15%), además de una pequeña cantidad biodisponible. Este dato es lógico si tenemos en cuenta que tras la digestión *in vitro*, la cantidad de carnosol de esta muestra es muy superior a la que se encuentra para las micelas y la nanoemulsión con aceite de soja. En la sección anterior, al emplear el extracto de romero sin digerir, no se ha encontrado carnosol en la fracción biodisponible hasta las 12 horas de tratamiento, contrariamente a lo que ocurre en este caso, donde con tan sólo 4 horas se detecta, hecho lógico si se considera el incremento en la cantidad de carnosol en la muestra tras la digestión *in vitro*.

Estos resultados confirman que la biodisponibilidad del ácido carnósico y el carnosol mejora de forma sustancial tras la inclusión del extracto de romero en las caseínas y en la nanoemulsión, ya que en tan solo 4 horas se encuentra una cantidad cercana al 10% en la fracción biodisponible, hecho que no se detecta tras incorporar la muestra digerida del extracto directamente. Comparando estos resultados con los detallados en la sección anterior, para obtener unos valores similares de biodisponibilidad de ácido carnósico, son necesarias al menos 8 horas de tratamiento tras la incorporación del extracto sin digerir, por lo que los modelos empleados mejoran su biodisponibilidad.

De esta manera, está descrito en la bibliografía cómo la formulación de compuestos hidrofóbicos en lípidos mejora su solubilidad y por tanto su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal (Porter y col., 2008). Las nanoemulsiones de curcumina favorecen la biodisponibilidad *in vitro* de este compuesto, empleando para ello un modelo de células Caco-2, frente a la curcumina sin encapsular (Memvanga y col., 2013). También, está descrito cómo la nanoencapsulación de vitamina D utilizando caseínas, mejora su biodisponibilidad en humanos, tras su ingesta (Haham y col., 2012).

Los datos obtenidos muestran que la incorporación del extracto de romero en las caseínas ejerce un efecto protector durante el proceso de digestión y aumenta su biodisponibilidad respecto a su administración sin protección. Por tanto, la incorporación del extracto supercrítico de romero en una matriz de origen lácteo es una alternativa interesante, iniciándose así la posibilidad de desarrollar nuevos alimentos de origen lácteo.

Los resultados obtenidos con la nanoemulsión de aceite de soja también indican que la incorporación del extracto de romero a esta emulsión, favorece su protección

durante el proceso de digestión y aumenta su biodisponibilidad. Por tanto, también sería interesante la formulación del extracto en este tipo de matrices de cara a su incorporación en otro tipo de alimentos, una posibilidad de gran interés para la industria alimentaria que ayudaría a incorporar en alimentos compuestos poco solubles, que plantean diversas dificultades técnicas (Fang y Bhandari, 2010; Huang y col., 2010).

Por todo ello, ha quedado demostrado que la actividad antiinflamatoria del extracto supercrítico de romero le convierten en un ingrediente funcional idóneo para la formulación de alimentos de uso específico para la salud.

4



Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse de este trabajo, según los objetivos parciales que se plantearon al inicio del mismo, son las siguientes:

Objetivo 1.- Identificación de la materia prima más adecuada y del procedimiento idóneo para la obtención de extractos naturales antiinflamatorios útiles como ingredientes bioactivos de uso alimentario.

- Los extractos obtenidos a partir de las diferentes especies de plantas estudiadas, tanto por tecnología de fluidos supercríticos como por líquidos presurizados, poseen actividad antiinflamatoria, ya que disminuyen la secreción y la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esta actividad se ha demostrado tanto cuando los macrófagos se han activado con LPS como en presencia de LDLox, aunque, en general, los extractos presentan una mayor actividad cuando se evalúan en el modelo mediado por un proceso de oxidación.
- Los estudios sobre la influencia del tiempo de tratamiento de los macrófagos en la actividad antiinflamatoria de los distintos extractos muestran que, seis horas de tratamiento son suficientes para que se produzca una disminución en la liberación y expresión génica de las citoquinas proinflamatorias.
- La extracción con CO₂ supercrítico es la tecnología más adecuada y el romero la materia prima más favorable para obtener extractos con una alta actividad antiinflamatoria.
- La elevada actividad antioxidante que presenta el extracto supercrítico de romero podría estar asociada con la mayor actividad antiinflamatoria determinada en el modelo mediado por oxidación.

Objetivo 2.- Caracterización de los componentes de los extractos que determinan su actividad antiinflamatoria.

- Los componentes en los que se basa la actividad antiinflamatoria del extracto supercrítico de romero son el ácido carnósico (presente en un 18%) y el carnosol (presente en un 1,6%), además del 1,8-cineol y el alcanfor. Estos compuestos poseen actividad antiinflamatoria al inhibir individualmente tanto la liberación como la

expresión génica de las citoquinas proinflamatorias, siendo el ácido carnósico y el carnosol los compuestos que muestran una mayor actividad.

- Los extractos de mejorana y romero obtenidos mediante líquidos presurizados se caracterizan porque muestran un alto contenido en ácido rosmarínico, lo que no ocurre en los extractos con CO₂ supercrítico. El ácido rosmarínico también presenta individualmente una alta actividad antiinflamatoria.

Objetivo 3.- Elección del procedimiento óptimo para la producción de extractos naturales con alta actividad antiinflamatoria.

- El extracto supercrítico de romero obtenido con un 5% de etanol como modificador presenta el mayor contenido tanto en ácido carnósico como en carnosol de todos los extractos estudiados en el presente trabajo, presentando también la mayor actividad antiinflamatoria de las determinadas.
- Cuando se comparó la actividad antiinflamatoria del extracto obtenido con un 5% de etanol con la que presentan individualmente el ácido carnósico y el carnosol, se observó que el extracto posee una mayor actividad que dichos compuestos por separado, hecho que puede deberse a la presencia en el extracto de 1,8-cineol y alcanfor, compuestos para los que también se ha detectado esta actividad.

Objetivo 4.- Estudio de la influencia de la composición de los extractos naturales de alta actividad antiinflamatoria en su biodisponibilidad.

- En los ensayos de biodisponibilidad llevados a cabo con el extracto supercrítico de romero obtenido con un 5% de etanol, la fracción biodisponible contiene ácido carnósico (tras 8 horas de ensayo) y carnosol (tras 12 horas). La fracción biodisponible final (12h) incluye un 25% del ácido carnósico y un 3% del carnosol con relación a las cantidades presentes en el extracto de partida.
- La fracción biodisponible de este extracto de romero presenta una importante actividad antiinflamatoria, siendo esta superior a la atribuible a la mezcla de patrones de ácido carnósico y carnosol.

Objetivo 5.- Formulación de los extractos de alta actividad antiinflamatoria para mejorar su biodisponibilidad y adecuar sus propiedades para la incorporación a matrices alimentarias.

- La encapsulación del extracto de romero utilizando micelas de caseína, procedentes de la leche, protege al extracto de su degradación durante el proceso de digestión *in vitro*.
- La biodisponibilidad del extracto de romero aumenta tras su encapsulación en caseínas, de modo que en los ensayos de absorción el tiempo necesario para detectar la presencia de ácido carnósico en la fracción biodisponible se reduce considerablemente.

4.1 Conclusions

The conclusions that summarized this work according to the objectives mentioned at the beginning of this thesis are:

Objective 1.- Identifying the most suitable raw material and proper method to obtain anti-inflammatory natural extracts to be used as food-grade bioactive ingredients.

- Specific plant extracts obtained using supercritical fluid technologies and pressurized solvents showed anti-inflammatory activities since they were able to reduce both secretion and gene expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. This activity was demonstrated using two inflammation models although results were more remarkable in the oxidation-mediated model.
- The assays carried out to investigate the time required to induce an anti-inflammatory answer in macrophages indicated that 6 h treatment was sufficient to induce an inhibition in the release and gene expression of proinflammatory cytokines.
- Supercritical CO₂ extraction is the best technology to obtain extracts with high anti-inflammatory activity and rosemary the most interesting source of anti-inflammatory compounds.
- The high antioxidant activity showed by the supercritical rosemary extract was related to its high anti-inflammatory activity, according to the results obtained by the oxidation-mediated model

Objective 2.- Characterization of the extract compounds responsible for their anti-inflammatory activity.

- The compounds responsible for the anti-inflammatory activity of the supercritical rosemary extract were carnosic acid (18% of the extract) and carnosol (1.6% of the extract) as well as 1,8-cineole and camphor. When applied as single compounds, they inhibited both the release and gene expression of the proinflammatory cytokines,

being carnosol and carnosic acid the compounds with higher anti-inflammatory activity.

- Marjoram and rosemary extracts obtained by pressurized fluids showed a high rosmarinic acid concentration that was lacking in the supercritical CO₂ extracts. Single rosmarinic acid also showed high anti-inflammatory activity.

Objective 3.– Selection of the optimal procedure to obtain natural extracts with high anti-inflammatory activity.

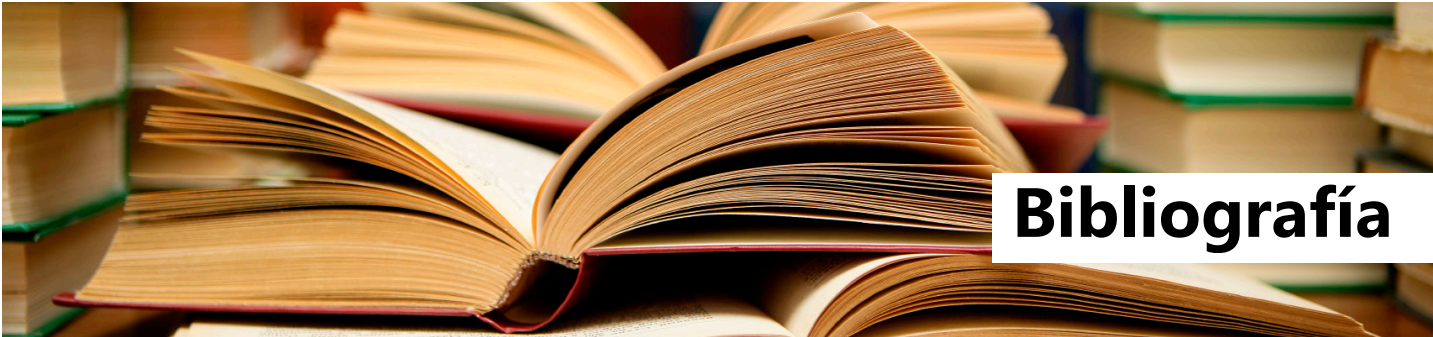
- The rosemary supercritical extract obtained with 5% ethanol as modifier contained the highest carnosic acid and carnosol concentrations of all studied extracts and they also showed the highest anti-inflammatory activity.
- The anti-inflammatory activity of the rosemary extract obtained with 5% ethanol was higher than the one observed when carnosic acid and carnosol were separately applied. This might be due to the presence of 1,8 cineole and camphor in the extract since they also showed anti-inflammatory activity.

Objective 4.- Study of the bioavailability of the natural extracts with high anti-inflammatory activity depending on their composition

- Results obtained from the bioavailability tests carried out with the supercritical rosemary extract obtained with 5% ethanol indicated that the bioavailable fraction contained carnosic acid (after 8 h incubation) and carnosol (after 12 h). The latter bioavailable fraction included 25% carnosic acid and 3% carnosol of the initially applied extract.
- The bioavailable fraction of rosemary extract showed a significantly higher anti-inflammatory activity than that presented by the mixture of carnosic acid and carnosol.

Objective 5.- Formulation of extracts with high anti-inflammatory activity to enhance their bioavailability and to facilitate their incorporation into food matrices.

- The encapsulation of the rosemary extract inside casein micelles from milk, protected it from degradation during the in vitro digestion process
- The bioavailability of rosemary extract increased after encapsulation with caseins since in the transport assays, the time required to detect carnosic acid in the bioavailable fraction is largely reduced.



Bibliografía

- Abbas, A. K.**, Lichtman, A. H. y Pillai, S. 2012. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier. Philadelphia, 7ª Edición.
- Achoui, M.**, Appleton, D., Abdulla, M. A., Awang, K., Mohd, M. A. y Mustafa, M. R. 2010. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of 17-O-acetylacuminolide through the inhibition of cytokines, NF- κ B translocation and I κ K β activity. PLoS One. 5, 0015105.
- Ahn, C.-B.** y Je, J.-Y. 2012. Anti-inflammatory activity of the oriental herb medicine, *Arisaema cum* bile, in LPS-induced PMA-differentiated THP-1 cells. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 34, 379-384.
- Akiyama, H.**, Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G., Cooper, N., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B., Finch, C., Frautschy, S., Griffin, W., Hampel, H., Hull, H., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I., McGeer, P., O'Banion, M., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. y Wyss-Coray, T. 2000. Inflammation and alzheimer's disease. Neurobiological Aging. 21, 383-421.
- Al-Howiriny, T.**, Alsheikh, A., Alqasoumi, S., Al-Yahya, M., ElTahir, K. y Rafatullah, S. 2009. Protective effect of *Origanum majorana* L. 'marjoram' on various models of gastric mucosal injury in rats. American Journal of Chinese Medicine. 37, 531-545.
- Al-Kalaldeh, J. Z.**, Abu-Dahab, R. y Afifi, F. U. 2010. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. Nutrition Research. 30, 271-8.
- Almajano, M. P.**, Carbó, R., Jiménez, J. A. L. P. y Gordon, M. H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry. 108, 55-63.
- Almela, L.**, Sánchez-Munoz, B., Fernández-Lopez, J. A., Roca, M. J. y Rabe, V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. Journal of Chromatography A. 1120, 221-229.
- Alonso, J. R.** 1998. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. I. Ediciones. Buenos Aires, Argentina,
- Allen-Hall, L.**, Cano, P., Arnason, J. T., Rojas, R., Lock, O. y Lafrenie, R. M. 2007. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 β and TNF- α . Journal of Ethnopharmacology. 109, 312-317.
- Anand, P.**, Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R., Tekmal, R. R. y Aggarwal, B. B. 2010. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. Biochemical Pharmacology. 79, 330-338.
- Angel-Morales, G.**, Noratto, G. y Mertens-Talcott, S. U. 2012. Standardized curcuminoid extract (*Curcuma longa* L.) decreases gene expression related to inflammation and interacts with associated microRNAs in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Food & Function. 3, 1286-1293.
- Annunziata, A.** y Vecchio, R. 2011. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. Journal of Functional Foods. 3, 223-228.
- Arai, S.** 1996. Studies on functional foods in Japan-state of the art. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 60, 9-15.

- Arias-Aranda, D.** y Romerosa-Martínez, M. M. 2010. Innovation in the functional foods industry in a peripheral region of the European Union: Andalusia (Spain). *Food Policy*. 35, 240-246.
- Arraiza, M. P.**, Arrabal, C. y Lopez, J. V. 2012. Seasonal variation of essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) grown in Castilla - La Mancha (central Spain). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 40, 106-108.
- Atul Bhattaram, V.**, Graefe, U., Kohlert, C., Veit, M. y Derendorf, H. 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal Products. *Phytomedicine*. 9, Supplement 3, 1-33.
- Aviram, M.**, Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. y Fuhrman, B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1062-1076.
- Bais, H. P.**, Walker, T. S., Schweizer, H. P. y Vivanco, J. M. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40, 983-995.
- Bakhtiarian, A.**, Khanavi, M. y Moghaddam, F. A. 2011. Anti-inflammatory effect of *Thymus kotschyianus* extract on rat's hind paw edema induced by carrageenan. *Toxicology Letters*. 205, Supplement, S235-S236.
- Bakkali, F.**, Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446-475.
- Balkwill, F.** y Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet* 357, 539-545
- Bangou, M. J.**, Kiendrebeogo, M., Meda, N.-T. R., Coulibaly, A. Y., Compaore, M., Zeba, B., Millogo-Rasolodimby, J. y Nacoulma, O. G. 2011. Evaluation of enzymes inhibition activities of medicinal plant from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 14, 99-105.
- Barberá Mateos, J. M.** y Marcos, A. 2008. Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Inutcam. Salud Madrid.
- Barras, A.**, Mezzetti, A., Richard, A., Lazzaroni, S., Roux, S., Melnyk, P., Betbeder, D. y Monfilliette-Dupont, N. 2009. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*. 379, 270-277.
- Baylac, S.** y Racine, P. 2003. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*. 13, 138-142.
- Beery, T. A.** 2003. Sex differences in infection and sepsis. *Critical Care Nursing Clinics of North America*. 15, 55-62.
- Ben-Neriah, Y.** y Karin, M. 2011. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology*. 12, 715-723.
- Benedec, D.**, Parvu, A. E., Oniga, I., Toiu, A. y Tipericiuc, B. 2007. Effects of *Ocimum basilicum* L. extract on experimental acute inflammation. *Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*. 111, 1065-9.

Benincá, J. P., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G. y Fröde, T. S. 2011. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. Food Chemistry. 124, 468-475.

Beric, T., Nikolic, B., Stanojevic, J., Vukovic-Gacic, B. y Knezevic-Vukcevic, J. 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. Food and Chemical Toxicology. 46, 724-732.

Bermejo, D. V., Luna, P., Manic, M. S., Najdanovic-Visak, V., Reglero, G. y Fornari, T. 2012. Extraction of caffeine from natural matter using a bio-renewable agrochemical solvent. Food and Bioproducts Processing. En prensa.

Bestwick, C. S. y Milne, L. 2000. Effects of β -carotene on antioxidant enzyme activity, intracellular reactive oxygen and membrane integrity within post confluent Caco-2 intestinal cells. Biochimica et Biophysica Acta. 6, 47-55.

Bhaskar, S., Shalini, V. y Helen, A. 2011. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF κ B signaling pathway. Immunobiology. 216, 367-373.

BOE 2006. LEY 44/2006, de 29 de diciembre, de mejora de la protección de los consumidores y usuarios. p. 46601-46611.

BOE 2009. Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios.

Borrás-Linares, I., Arraez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A. y Fernández-Gutiérrez, A. 2011. Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1218, 7682-7690.

Boyle, R., McLean, S., Brandon, S. y Wiggins, N. 2005. Rapid absorption of dietary 1,8-cineole results in critical blood concentration of cineole and immediate cessation of eating in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). Journal of Chemical Ecology. 31, 2775-2790.

Brasier, A. R. 2010. The nuclear factor- κ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. Cardiovascular Research. 86, 211-218.

Bukovská, A., Cikoš, Š., Juhás, Š., Il'ková, G., Rehák, P. y Koppel, J. 2007. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice. Mediators of Inflammation. 2007, 23296,

Cadoni, E., Rita De Giorgi, M., Medda, E. y Poma, G. 1999. Supercritical CO₂ extraction of lycopene and [beta]-carotene from ripe tomatoes. Dyes and Pigments. 44, 27-32.

Calder, P. C., Ahluwalia, N., Albers, R., Bosco, N., Bourdet-Sicard, R., Haller, D., Holgate, S. T., Jonsson, L. S., Latulippe, M. E., Marcos, A., Moreines, J., M'Rini, C., Muller, M., Pawelec, G., van Neerven, R. J. J., Watzl, B. y Zhao, J. 2013. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. British Journal of Nutrition. 109, S1-S34.

Campbell, R. M. y Lee, M. L. 1986. Supercritical fluid fractionation of petroleum and coal-derived mixtures. Analytical Chemistry. 58, 2247-2251.

- Camporese, A.**, Balick, M. J., Arvigo, R., Esposito, R. G., Morsellino, N., Simone, F. D. y Tubaro, A. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*. 87, 103-107.
- Cañigüeral, S.**, Vila, R. y Wicht, M. 1998. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusiones y tisana. OEMF International. Barcelona, 1ª Edición.
- Castroviejo, S.** 2012. Flora Iberica plantas vasculares de la península Ibérica e islas Baleares. C. Real Jardín Botánico. Madrid, España,
- CE** 2006. Reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea. p. 404/9-25.
- Curren, M. S. S.** y King, J. W. 2001a. Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solidphase microextraction for determining atrazine in beef kidney. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2175-2180.
- Curren, M. S. S.** y King, J. W. 2001b. Solubility of triazine pesticides in pure and modified subcritical water. *Analitical Chemistry*. 73, 740-745.
- Chan, H. H.**, Hwang, T. L., Su, C. R., Reddy, M. V. y Wu, T. S. 2011. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidative constituents from the roots and the leaves of *Salvia nipponica* Miq. var. *formosana*. *Phytomedicine*. 18, 148-50.
- Chao, R. R.**, Mulvaney, S. J. y Bailey, M. E. 1991. Supercritical CO₂ conditions affecting extraction of lipid and cholesterol from ground beef. *Journal of Food Science*. 56, 183-187.
- Charles, D. J.** y Simon, J. E. 1990. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of *Basil*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 115, 458-462.
- Charlier, C.** y Michaux, C. 2003. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 38, 645-659.
- Chen, C.** 2010. Casein complexes. Patente 2010/0099607 A1,
- Cheung, S.** y Tai, J. 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology Reports*. 17, 1525-1531.
- Chiang, L.-C.**, Ng, L.-T., Cheng, P.-W., Chiang, W. y Lin, C.-C. 2005. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 32, 811-816.
- Chohan, M.**, Naughton, D. P., Jones, L. y Opara, E. I. 2012. An investigation of the relationship between the anti-Inflammatory activity, polyphenolic content, and antioxidant activities of cooked and *in vitro* digested culinary herbs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012,
- Choi, J.-H.**, Yoo, J.-Y., Kim, S.-O., Yoo, S.-E. y Oh, G. T. 2012. KR-31543 reduces the production of proinflammatory molecules in human endothelial cells and monocytes and attenuates atherosclerosis in mouse model. *Experimental and Molecular Medicine*. 44, 733-739.
- Choi, M. S.**, Lee, W. H., Kwon, E. Y., Kang, M. A., Lee, M. K., Park, Y. B. y Jeon, S. M. 2007. Effects of soy pinitol on the pro-inflammatory cytokines and scavenger receptors in

oxidized low-density lipoprotein-treated THP-1 macrophages. *Journal of Medical Food*. 10, 594-601.

Chu, C.-Y., Lee, H.-J., Chu, C.-Y., Yin, Y.-F. y Tseng, T.-H. 2009. Protective effects of leaf extract of *Zanthoxylum ailanthoides* on oxidation of low-density lipoprotein and accumulation of lipid in differentiated THP-1 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1265-1271.

Chun, S.-S., Vatter, D. A., Lin, Y.-T. y Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*. 40, 809-816.

d'Alessio, P. A., Ostan, R., Bisson, J.-F., Schulzke, J. D., Ursini, M. V. y Bene, M. C. 2013. Oral administration of d-limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sciences*. 92, 1151-1156.

Dalgleish, D. G. y Corredig, M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*. 3, 449-467.

Darandale, S. S. y Vavia, P. R. 2013. Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 75, 315-322.

de la Guardia, M. y Armenta, S. 2011. Greening simple treatments. *Comprehensive Analytical Chemistry*. M. de la Guardia & S. Armenta. Amsterdam, Holanda, Elsevier.

del Angel, C. R. y Dalgleish, D. G. 2006. Structures and some properties of soluble protein complexes formed by the heating of reconstituted skim milk powder. *Food Research International*. 39, 472-479.

Delgado-Zamarreño, M. M., Bustamante-Rangel, M., Martínez-Pelarda, D. y Carabias-Martínez, R. 2009. Analysis of β -sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Science*. 25, 765-768.

Deshpande, D., Janero, D. R. y Amiji, M. 2013. Engineering of an omega-3 polyunsaturated fatty acid-containing nanoemulsion system for combination C6-ceramide and 17 β -estradiol delivery and bioactivity in human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. En prensa.

Detmers, P. A., Hernández, M., Mudgett, J., Hassing, H., Burton, C., Mundt, S., Chun, S., Fletcher, D., Card, D. J., Lisnock, J., Weikel, R., Bergstrom, J. D., Shevell, D. E., Hermanowski-Vosatka, A., Sparrow, C. P., Chao, Y. S., Rader, D. J., Wright, S. D. y Pure, E. 2000. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Immunology*. 165, 3430-5.

Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D. y Pittia, P. 2009. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*. 42, 1163-1170.

Díaz-Rojas, E. I., Pacheco-Aguilar, R., Lizardi, J., Argüelles-Monal, W., Valdez, M. A., Rinaudo, M. y Goycoolea, F. M. 2004. Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. *Food Hydrocolloids*. 18, 293-304.

Dihal, A. A., Woutersen, R. A., Ommen, B. v., Rietjens, I. M. C. M. y Stierum, R. H. 2006. Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Letters*. 238, 248-259.

- Diplock, A. T.**, Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B. y Roberfroid, M. B. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. British Journal of Nutrition. 81, S1-27.
- Djarmati, Z.**, Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Djulinac, B., Djordjevic, A. 1991. High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂. Journal of the American Oil Chemists 68, 31-734.
- Doolaee, E. H.**, Raes, K., De Vos, F., Verhe, R. y De Smet, S. 2011. Absorption, distribution and elimination of carnosic acid, a natural antioxidant from *Rosmarinus officinalis*, in rats. Plant Foods and Human Nutrition. 66, 196-202.
- dos Santos Freitas, L.**, Jacques, R. A., Richter, M. F., da Silva, A. L. y Bastos Carmao, E. 2008. Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. Journal of Chromatography A. 1200, 80-83.
- EC** 2003. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims made on foods. Bruselas. p. 16.7.2003 COM. 424 final.
- Ehrnhöfer-Ressler, M. M.**, Fricke, K., Pignitter, M., Walker, J. M., Walker, J., Rychlik, M. y Somoza, V. 2013. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61, 3451-3459.
- Emanuelli, B.**, Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., Freidinger, K., Hilton, D. J., Hotamisligil, G. S. y Van Obberghen, E. 2001. SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. Journal of Biological Chemistry. 276, 47944-47949.
- Ezzeddine, N. B. H.-B.**, Abdelkéfi, M. M., Aissa, R. B. y Chaabouni, M. M. 2001. Antibacterial screening of *Origanum majorana* L. oil from Tunisia. Journal of Essential Oil Research. 13, 295-297.
- Fang, J.-Y.**, Hung, C.-F., Liao, M.-H. y Chien, C.-C. 2007. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 67, 67-75.
- Fang, Z.** y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in Food Science & Technology. 21, 510-523.
- FAO**. 2013, Codex Alimentarius. <http://www.codexalimentarius.org/>.
- Fornari, T.**, Ruiz-Rodríguez, A., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R. y Reglero, G. 2012a. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. The Journal of Supercritical Fluids. 64, 1-8.
- Fornari, T.**, Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R. y Reglero, G. 2012b. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. Journal of Chromatography A. 2012, 34-48.
- Froning, G. W.**, Wehling, R. L., Cuppett, S. y Niemann, L. 1998. Moisture content and particle size of dehydrated egg yolk affect lipid and cholesterol extraction using supercritical carbon dioxide. Poultry Science. 77, 1718-1722.
- Fu, Y.**, Chen, J., Li, Y.-J., Zheng, Y.-F. y Li, P. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. Food Chemistry. 141, 1063-1071.

- Fuhrman, B.**, Partoush, A., Volkova, N. y Aviram, M. 2008. Ox-LDL induces monocyte-to-macrophage differentiation *in vivo*: Possible role for the macrophage colony stimulating factor receptor (M-CSF-R). *Atherosclerosis*. 196, 598-607.
- Ganster, R. W.**, Taylor, B. S., Shao, L. y Geller, D. A. 2001. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 8638-43.
- García-Risco, M. R.**, Hernández, E. J., Vicente, G., Fornari, T., Señoráns, F. J. y Reglero, G. 2011a. Kinetic study of pilot-scale supercritical CO₂ extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55, 971-976.
- García-Risco, M. R.**, Vicente, G., Reglero, G. y Fornari, T. 2011b. Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55, 949-954.
- Gautam, R.** y Jachak, S. M. 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*. 29, 767-820.
- Gerothanassis, I. P.**, Exarchou, V., Lagouri, V., Troganis, A., Tsimidou, M. y Boskou, D. 1998. Methodology for identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two-dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two *Oregano* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 4185-4192.
- Gibson, G. R.** 2004. From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *Journal of Food Science*. 69, M141-M143.
- Glisic, S.**, Ivanovic, J., Ristic, M. y Skala, D. 2010. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 52, 62-70.
- Gökmen, V.**, Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z. y Shimoni, E. 2011. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*. 105, 585-591.
- Goldstein, A.** y Seetharaman, K. 2011. Effect of a novel monoglyceride stabilized oil in water emulsion shortening on cookie properties. *Food Research International*. 44, 1476-1481.
- Golmakani, M. T.**, Mendiola, J. A., Rezaei, K. y Ibáñez, E. 2012. Expanded ethanol with CO₂ and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ -linolenic acid from *Arthrospira platensis* (Spirulina). *The Journal of Supercritical Fluids*. 62, 109-115.
- Gómez-Hernández, A.**, Martín-Ventura, J. L., Sánchez-Galan, E., Vidal, C., Ortego, M., Blanco-Colio, L. M., Ortega, L., Tunon, J. y Egido, J. 2006. Overexpression of COX-2, prostaglandin-E synthase-1 and prostaglandin-E receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: Regulation by nuclear factor-kappa B. *Atherosclerosis*. 187, 139-149.
- Gonzales, A. M.** y Orlando, R. A. 2008. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition & Metabolism*. 5, 17.
- González-Vallinas, M.**, Molina, S., Vicente, G., de la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G. y Ramírez de Molina, A. 2013. Antitumor effect

of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research*. 72, 61-8.

Göran, K. y Hansson, M. D. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*. 352, 1685-1695.

Grzanna, R., Phan, P., Polotsky, A., Lindmark, L. y Frondoza, C. G. 2004. Ginger extract inhibits beta-amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in cultured THP-1 monocytes. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 10, 1009-1013.

Gulluce, M., Karadayi, M., Guvenalp, Z., Ozbek, H., Arasoglu, T. y Baris, O. 2012. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chemistry*. 130, 248-253.

Guri, A., Haratifar, S. y Corredig, M. 2013. Bioavailability of tea catechins encapsulated in milk caseins using different digestion models. 2nd International Conference on Food Digestion, Madrid,

Haham, M., Ish-Shalom, S., Nodelman, M., Duek, I., Segal, E., Kustanovich, M. y Livney, Y. D. 2012. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food & Function*. 3, 737-744.

Harusato, A., Naito, Y., Takagi, T., Uchiyama, K., Mizushima, K., Hirai, Y., Higashimura, Y., Katada, K., Handa, O., Ishikawa, T., Yagi, N., Kokura, S., Ichikawa, H., Muto, A., Igarashi, K. y Yoshikawa, T. 2013. BTB and CNC homolog 1 (Bach1) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice: role of M2 macrophages and heme oxygenase-1. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19, 740-753.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A. y Ibáñez, E. 2013. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. 43, 67-83.

Herrero, M., Cifuentes, A. y Ibáñez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*. 98, 136-148.

Herrero, M., Simó, C., Ibáñez, E. y Cifuentes, A. 2005. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of *Spirulina platensis* proteins obtained by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis*. 26, 4215-4224.

Herrero, M., Vicente, M. J., Cifuentes, A. y Ibáñez, E. 2007. Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21, 1729-1739.

Higashimura, Y., Naito, Y., Takagi, T., Mizushima, K., Hirai, Y., Harusato, A., Ohnogi, H., Yamaji, R., Inui, H., Nakano, Y. y Yoshikawa, T. 2013. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression. *Journal of Gastroenterology*. 48, 897-909.

Hong, J.-W., Yang, G.-E., Kim, Y. B., Eom, S. H., Lew, J.-H. y Kang, H. 2012. Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract *in vivo* and *in vitro* LPS-induced models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12,

Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M. y Iwakura, Y. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling

rheumatoid arthritis in interleukin-1-receptor antagonist-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 191, 313-320.

Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martín-Diana, A. B. y Brunton, N. P. 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*. 126, 339-346.

Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M. H. y Arash, A. R. 2003. Antinociceptive, antiinflammatory and acute toxicity of *Salvia leriifolia* Benth. seed extract in mice and rats. *Phytotherapy Research*. 17, 422-425.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. y Spiegelman, B. M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 259, 87-91.

Huang, H., Fletcher, A., Niu, Y., Wang, T. T. Y. y Yu, L. 2012. Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. *Inflammation Research*. 61, 1329-1338.

Huang, J.-R., Wu, C.-C., Hou, R. C.-W. y Jeng, K.-C. 2008. Bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human THP-1 monocytes via the removal of CD14. *Immunological Investigations*. 37, 263-277.

Huang, Q., Yu, H. y Ru, Q. 2010. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*. 75, 1750-3841.

Huang, Z. F., Massey J. B. y Via D. P. 2000. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by Interleukin-1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) in human *in vitro* differentiated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 59, 187-194.

Içen, H. y Gürü, M. 2009. Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 50, 225-228.

Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ilidrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., Altinier, G., Della Loggia, R. y Aquino, R. 2004. *In vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 91, 31-36.

Jones, P. J. y Jew, S. 2007. Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Science & Technology*. 18, 387-390.

Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A. y Sotomayor, J. A. 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*. 24, 253-263.

Juhás, Š., Bujňáková, D., Rehák, P., Čikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., Il'ková, G. y Koppel, J. 2008a. Anti-Inflammatory effects of thyme essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno*. 77, 327-334.

Juhás, Š., Čikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., Il'ková, G., Hájek, T., Domaracká, K., Domaracký, M., Bujňáková, D., Rehák, P. y Koppel, J. 2008b. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia biologica*. 54, 1-7.

Jung, H. J., Song, Y. S., Lim, C. J. y Park, E. H. 2009. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. *Journal Ethnopharmacology*. 126, 355-60.

- Justesen, U.** y Knuthsen, P. 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*. 73, 245-250.
- Kabir, M.**, Skurnik, G., Naour, N., Pechtner, V., Meugnier, E., Rome, S., Quignard-Boulangé, A., Vidal, H., Slama, G. r., Clément, K., Guerre-Millo, M. y Rizkalla, S. W. 2007. Treatment for 2 mo with n-3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 86, 1670-1679.
- Kaefer, C. M.** y Milner, J. A. 2008. The role of herb and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19, 347-361.
- Kamatou, G. P. P.**, Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N. y Viljoen, A. M. 2008. South african *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*. 119, 664-672.
- Kamatou, G. P. P.**, Viljoen, A. M. y Steenkamp, P. 2010. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*. 119, 684-688.
- Kaperonis, E. A.**, Liapis, C. D., Kakisis, J. D., Dimitroulis, D. y Papavassiliou, V. G. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 31, 386-393.
- Kaushik, V.** y Roos, Y. H. 2007. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabica sucrose gelatin systems. *Food Science and Technology*. 40, 1381-1391.
- Kazlas, P. T.**, Novak, R. D. y Robey, R. J. 1994. Supercritical carbon dioxide decaffeination of acidified coffee. US Patent 5 288 511,
- Keller, C.** 2006. Trends in beverages and "Measurable health". Proceedings of the Third Functional Food Net Meeting,
- Kim, J.-A.**, Ahn, B.-N., Kong, C.-S. y Kim, S.-K. 2011. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages. *Inflammation Research*. 60, 1131-1138.
- Kim, J.-A.**, Kong, C.-S., Pyun, S. Y. y Kim, S.-K. 2010. Phosphorylated glucosamine inhibits the inflammatory response in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. *Carbohydrate Research*. 345, 1851-1855.
- Kim, J.**, Kim, H., Jung, B., Kim, N.-R., Park, J. y Chung, D. 2013. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* suppresses LPS-mediated atherosclerotic plaque inflammation. *Molecules and Cells*. 35, 115-24.
- Kokkini, S.**, Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N. y Lanaras, T. 1997. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*. 44, 883-886.
- Komaitis, M. E.**, Ifanti-Papatragianni, N. y Melissari-Panagiotou, E. 1992. Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.). *Food Chemistry*. 45, 117-118.
- Krause, E. L.** y Ternes, W. 2000. Bioavailability of the antioxidative *Rosmarinus officinalis* compound carnosic acid in eggs. *European Food Research and Technology*. 210, 161-164.
- Kris-Etherton, P. M.**, Lefevre, M., Beecher, G. R., Gross, M. D., Keen, C. L. y Etherton, T. D. 2004. Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for

establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*. 24, 511-38.

Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T. y Noda, T. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 25863-25866.

Kuo, C. F., Su, J. D., Chiu, C. H., Peng, C. C., Chang, C. H., Sung, T. Y., Huang, S. H., Lee, W. C. y Chyau, C. C. 2011. Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract and its isolated carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 3674-3685.

Kuppan, G., Balasubramanyam, J., Monickaraj, F., Srinivasan, G., Mohan, V. y Balasubramanyam, M. 2010. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. *Cytokine*. 49, 229-234.

Kurumbail, R. G., Stevens, A. N., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C. y Stallings, W. C. 1996. Structural basis for selective inhibition of ciclooxigenase 2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 384, 644-648.

La Cava, A., Alviggi, C. y Matarese, G. 2004. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine*. 82, 4-11.

Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y. y Chang, H. W. 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*. 13,

Lee, W. J., Ou, H. C., Hsu, W. C., Chou, M. M., Tseng, J. J., Hsu, S. L., Tsai, K. L. y Sheu, W. 2010. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *Journal of vascular surgery*. 52, 1290-300.

Lee, W. J., Ou, H. C., Wu, C. M., Lee, I. T., Lin, S. Y., Sheu, W. H. H., Lin, L. Y., Tsai, K. L. y Lee, S. D. 2009. Sesamin mitigates inflammation and oxidative stress in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 11406-17.

Lehotay, S. J. 1997. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of Chromatography A*. 785, 289-312.

Leitinger, N. 2003. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 14, 421-430.

Liang, Q., Yu, F., Cui, X., Duan, J. a., Wu, Q., Nagarkatti, P. y Fan, D. 2013. Sparstolonin B suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Archives of Pharmacal Research*. 36, 890-896.

Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420, 868-874.

Libby, P. M. 2008. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*. 121, 20-30.

Lim, G. P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Hsiao Ashe, K., Frautschy, S. A. y Cole, G. M. 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and

inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 5709-5714.

Lin, S. C., Chang, C. M. J. y Deng, J. T. S. 2009. Enzymatic hot pressurized fluids extraction of polyphenolics from *Pinus taiwanensis* and *Pinus morrisonicola*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40, 136-142.

Ling, Y. C., Teng, H. C. y Cartwright, C. 1999. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*. 835, 145-157.

Liu, H. J., Wang, X. L., Zhang, L., Qiu, Y., Li, T. J., Li, R., Wu, M. C., Wei, L. X. y Rui, Y. C. 2009. Inhibitions of vascular endothelial growth factor expression and foam cell formation by EGb 761, a special extract of *Ginkgo biloba*, in oxidatively modified low-density lipoprotein-induced human THP-1 monocytes cells. *Phytomedicine*. 16, 138-145.

Liu, J., Hong, S., Feng, Z., Xin, Y., Wang, Q., Fu, J., Zhang, C., Li, G., Luo, L. y Yin, Z. 2010. Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by heat shock protein 27 in THP-1 cells. *Cellular Immunology*. 264, 127-134.

Livney, Y. D. 2010. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 15, 73-83.

Livney, Y. D. y Dalgleish, D. G. 2007. Casein micelles for nanoencapsulation of hydrophobic compounds. PCT/IL2007/000496,

Loizzo, M. R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A. M., Statti, G. A., Cindio, B. d., Houghton, P. J., Menichini, F. y Frega, N. G. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*. 117, 174-180.

Lorkowski, S. y Cullen, P. 2007. Atherosclerosis: pathogenesis, clinical features and treatment. *Encyclopedia of Life Science*. 1-11.

Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J. M. y Núñez-Delicado, E. 2007. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chemistry*. 104, 39-44.

Lue, L. F., Rydel, R., Brigham, E. F., Yang, L., Hampel, H., Murphy, G., Brachova, L., Yan, S., Walker, D., Shen, Y. y J, R. 2001. Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia *in vitro*. *Glia*. 35, 72-79.

Lundgren, C. H., Brown, S. L., Nordt, T. K., Sobel, B. E. y Fujii, S. 1996. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*. 93, 106-110.

Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M. y Tena, M. T. 1993. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Reverté. España,

Luthria, D. L. 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*. 107, 745.

Mahmoudi, M., Morteza-Semnani, K. y Mojra, E. 2008. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Thymus pubescens* extract. *Fitoterapia*. 79, 361-365.

Mäkinen-Aakula, M. 2006. Trends in functional foods dairy market. The Third Functional Food Net Meeting,

- Manabe, M.**, Takenaka, R., Nakasa, T. y Okinaka, O. 2003. Induction of anti-inflammatory responses by dietary *Momordica charantia* L. (bitter gourd). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67, 2512-2517.
- Mantovani, A.**, Allavena, P., Sica, A. y Balkwill, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454, 436-444.
- Matsumoto, H.**, Erickson, R. H., Gum, J. R., Yoshioka, M., Gum, E. y Kim, Y. S. 1990. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology*. 98, 1199-207.
- McClements, D. J.**, Decker, E. A., Park, Y. y Weiss, J. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49, 577-606.
- Medzhitov, R.** 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454, 428-35.
- Memvanga, P. B.**, Coco, R. y Pr  at, V. 2013. An oral malaria therapy: Curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with β -arteether. *Journal of Controlled Release*. En prensa.
- Mendiola, J. A.**, Herrero, M., Cifuentes, A. y Ibáñez, E. 2007. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*. 1152, 234-246.
- Mengoni, E. S.**, Vichera, G., Rigano, L. A., Rodríguez-Puebla, M. L., Galliano, S. R., Cafferata, E. E., Pivetta, O. H., Moreno, S. y Vojnov, A. A. 2011. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*. 82, 414-421.
- Mercader-Ros, M. T.**, Lucas-Abellán, C., Fortea, M. I., Gabaldón, J. A. y Núñez-Delicado, E. 2010. Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*. 118, 769-773.
- Miguel, M. G.** 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*. 15, 9252-9287.
- Milos, M.**, Mastelic, J. y Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*. 71, 79-83.
- Minaian, M.**, Ghannadi, A. R., Afsharipour, M. y Mahzouni, P. 2011. Effects of extract and essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. on TNBS-induced colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 6, 13-21.
- MINECO**. 2013, Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. <http://www.idi.mineco.gob.es/>.
- Miron, T. L.**, Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E. y Herrero, M. 2011. Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants *Journal of Chromatography A*. 1218, 4918-4927.
- Mohamed-Ali, V.**, Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein, S. y Coppack, S. W. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82, 4196-4200.
- Monar, J.** 2007. The Spanish functional food market: Present and future perspectives. Functional FoodNet (FFNet) network meeting, IATA-CSIC,

- Morita, I.** 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 69, 165-75.
- Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunology Methods. 65, 55-63.
- Mueller, M.,** Hobiger, S. y Jungbauer, A. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. Food Chemistry. 122, 987-996.
- Mullen, A.,** Loscher, C. E. y Roche, H. M. 2010. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. Journal of Nutritional Biochemistry. 21, 444-450.
- Mun, S.,** Decker, E. A. y McClements, D. J. 2007. Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. Food Research International. 40, 770-781.
- Murray, P. J.** y Smale, S. T. 2012. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways. Nature Immunology. 13, 916-924.
- Mustafa, A.,** Trevino, L. M. y Turner, C. 2012. Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. Molecules. 17, 1809-1818.
- Mustafa, A.** y Turner, C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. Analytica Chimica Acta. 703, 8-18.
- Nakagawa, K.** y Nagao, H. 2012. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 411, 129-139.
- Nakata, M.,** Yada, T., Soejima, N. y Maruyama, I. 1999. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. Diabetes. 48, 426-429.
- Nathan, C.** 2002. Points of control in inflammation. Nature. 420, 846-852.
- Nathan, C. F.** y Hibbs Jr, J. B. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current Opinion in Immunology. 3, 65-70.
- Nesterenko, A.,** Alric, I., Silvestre, F. y Durrieu, V. 2012. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. Food Research International. 48, 387-396.
- Nile, S. H.** y Khobragade, C. N. 2011. *In Vitro* anti-inflammatory and xanthine oxidase inhibitory activity of *Tephrosia purpurea* shoot extract. Natural Product Communications. 6, 1437-1440.
- Nile, S. H.** y Park, S. W. 2013. Optimized methods for *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 13, 95-100.
- O'Shea, J. J.** y Nutman, T. B. 2001. Immunoregulation. Encyclopedia of Life Science. 1-10.
- Ocaña-Fuentes, A.,** Arranz-Gutiérrez, E., Señorans, F.J., Reglero, G. 2010. Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. Food and Chemical Toxicology. 48, 1568-1575

- Oeckinghaus, A.**, Matthew S Hayden, M. S. y Ghosh, S. 2011. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunology*. 12, 695-708.
- Ohama, H.**, Ikeda, H. y Moriyama, H. 2006. Health foods and foods with health claims in Japan. *Toxicology*. 221, 95-111.
- Oomen, A. G.**, Rempelberg, C. J., Bruil, M. A., Dobbe, C. J., Pereboom, D. P. y Sips, A. J. 2003. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol*. 44, 281-7.
- Osterud, B.** y Bjorklid, E. 2003. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiological Reviews*. 83, 1069-1112.
- Otterbein, L. E.**, Bach, F. H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R. J., Flavell, R. A. y Choi, A. M. K. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature Medicine*. 6, 422-428.
- Ou, H. C.**, Song, T. Y., Yeh, Y. C., Huang, C. Y., Yang, S. F., Chiu, T. H., Tsai, K. L., Chen, K. L., Wu, Y. J., Tsai, C. S., Chang, L. Y., Kuo, W. W. y Lee, S. D. 2010. EGCG protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction by inhibiting LOX-1-mediated signaling. *Journal of Applied Physiology*. 108, 1745-56.
- Oxenham, S. K.**, Svoboda, K. P. y Walters, D. R. 2005. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*. 153, 174-180.
- Pan, X.**, Yao, P. y Jiang, M. 2007. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene. *Journal of Colloid and Interface Science*. 315, 456-463.
- Pasquali, I.** y Bettini, R. 2008. Are pharmaceuticals really going supercritical? *International Journal of Pharmaceutics*. 364, 176-187.
- Paul, A. T.**, Gohil, V. M. y Bhutani, K. K. 2006. Modulating TNF- α signaling with natural products. *Drug Discovery Today*. 11, 725-32.
- Pikarsky, E.**, Rinnat, M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. y Ben-Neriah, Y. 2004. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 431, 461-466.
- Pirbalouti, A. G.**, Hashemi, M. y Ghahfarokhi, F. T. 2013. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 48, 43-48.
- Poli, G.**, Sottero, B., Gargiulo, S. y Leonarduzzi, G. 2009. Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 30, 180-189.
- Polovka, M.**, Stavikova, L., Hohnova, B., Karasek, P. y Roth, M. 2011. Offline combination of pressurized fluid extraction and electron paramagnetic resonance spectroscopy for antioxidant activity of grape skin extracts assessment. *Journal of Chromatography A*. 1217, 7990-8000.
- Pollard, J. W.** 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Review Cancer*. 4, 71-78.

- Porter, C. J. H.**, Pouton, C. W., Cuine, J. F. y Charman, W. N. 2008. Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60, 673-691.
- Posadas, I.**, Terencio, M. C., Guillén, I., Ferrándiz, M. L., Coloma, J., Payá, M. y Alcaraz, M. J. 2000. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 361, 98-106.
- Priprem, A.**, Watanatorn, J., Sutthiparinyanont, S., Phachonpai, W. y Muchimapura, S. 2008. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 4, 70-78.
- Proestos, C.**, Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E. y Komaitis, M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1190-1195.
- Proestos, C.**, Sereli, D. y Komaitis, M. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*. 95, 44-52.
- Rac, M.** y Ostric-Matijasevic, B. 1955. The properties of rosemary as an antioxidant. *Review Français Corps Gras* 2. 796.
- Raetz, C. R.** y Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 71, 635-700.
- Ravipati, A. S.**, Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith, P. T., Shanmugam, K., Münch, G., Wu, M. J., Satyanarayanan, M. y Vysetti, B. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12, 173.
- Re, R.**, Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 26, 1231-7.
- Reglero, G.**, Frial, P., Señoráns, F., Ibáñez, E., Ruiz, A., Torres, C., Marín, F., Soler, C. y Rodríguez, M. 2004. Mezcla oleosa de ingredientes bioactivos naturales para la preparación de un producto alimenticio enriquecido. Patente PCT/ES2005/000600,
- Reverchon, E.** 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*. 10, 1-37.
- Ribeiro dos Santos, I.**, Richard, J., Pech, B., Thies, C. y Benoit, J. P. 2002. Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process. *International Journal of Pharmaceutics*. 242, 69-78.
- Ringbom, T.**, Huss, U., Stenholm, A., Flock, S., Skattebol, L., Perera, P. y Bohlin, L. 2001. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *Journal of Natural Products*. 64, 745-9.
- Robards, K.** y Antolovich, M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A Review. *Analyst*. 122, 11R-34R.
- Rodríguez-Meizoso, I.**, Marín, F. R., Herrero, M., Señoráns, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A. y Ibáñez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from

oregano. Chemical and functional characterization. Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41, 1560-5.

Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. y Mantovani, A. 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. Immunity. 6, 315-325.

Ross, R. 1999. Atherosclerosis - A inflammatory disease. Mechanisms of Disease. 230, 115-126.

Rossato, M., Curtale, G., Tamassia, N., Castellucci, M., Mori, L., Gasperini, S., Mariotti, B., De Luca, M., Mirolo, M., Cassatella, M. A., Locati, M. y Bazzoni, F. 2012. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109, 15.

Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G. y Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15, 549-557.

Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V. y Woolf, C. J. 2001. Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Nature. 410, 471-475.

Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A. y Zucco, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biology and Toxicology. 21, 1-26.

Santos, F. A. y Rao, V. S. N. 2000. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytotherapy Research. 14, 240-244.

Saraiva, M. y O'Garra, A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nature Reviews. 10, 170-81.

Satsu, H., Ishimoto, Y., Nakano, T., Mochizuki, T., Iwanaga, T. y Shimizu, M. 2006. Induction by activated macrophage-like THP-1 cells of apoptotic and necrotic cell death in intestinal epithelial Caco-2 monolayers via tumor necrosis factor- α . Experimental Cell Research. 312, 3909-3919.

Sauvant, P., Cansell, M., Hadj Sassi, A. y Atgié, C. 2012. Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. Food Research International. 46, 469-479.

Schoenmakers, P. J. y Uunk, L. G. M. 1987. Supercritical fluid chromatography. Recent and future developments. European Chromatography News. 1, 14-22.

Schwarz, K. y Ternes, W. 1992. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. Z Lebensm Unters Forsch. 195, 99-103.

Schwarz, K., Ternes, W. y Schmauderer, E. 1992. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. Z Lebensm Unters Forsch. 195, 104-7.

- Selvakkumar, C.**, Gayathri, B., Vinaykumar, K. S., Lakshmi, B. S. y Balakrishnan, A. 2007. Potential anti-inflammatory properties of crude alcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Health Science*. 53, 500-505.
- Semo, E.**, Kesselman, E., Danino, D. y Livney, Y. D. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*. 21, 936-942.
- Senn, J. J.**, Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Furlanetto, R. W. y Mooney, R. A. 2003. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 13740-13746.
- Señoráns, F. J.**, Ruiz-Rodríguez, A., Ibáñez, E., Tabera, J. y Reglero, G. 2001. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 1895-1899.
- Sessa, M.**, Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. y Donsì, F. 2011. Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 12352-12360.
- Shan, B.**, Cai, Y. Z., Sun, M. y Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7749-7759.
- Shao, J.**, Li, X., Lu, X., Jiang, C., Hu, Y., Li, Q., You, Y. y Fu, Z. 2009. Enhanced growth inhibition effect of resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 72, 40-47.
- Sharma, A. K.**, Prokopczyk, B. y Hoffmann, D. 1991. Supercritical fluid extraction of moist snuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39, 508-510.
- Shchors, K.**, Shchors, E., Rostker, F., Lawlor, E. R., Brown-Swigart, L. y Evan, G. I. 2006. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1 β . *Genes Development*. 20, 2517-2538.
- Shi, L. E.**, Li, Z. H., Zhang, Z. L., Zhang, T. T., Yu, W. M., Zhou, M. L. y Tang, Z. X. 2013. Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. *Food Science and Technology*. 54, 147-151.
- Shi, T. Y.** y Kim, H. M. 2002. Inhibition of immediate-type allergic reactions by the aqueous extract of *Salvia plebeia*. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*. 24, 303-14.
- Shimoi, K.**, Nakayama, T., Helmut, S. y Lester, P. 2005. Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods in Enzymology*. Academic Press. Volume 400: 263-272.
- Shutava, T. G.**, Balkundi, S. S. y Lvov, Y. M. 2009. (-)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*. 330, 276-283.
- Singh, S.** 1999. Mechanism of action of antiinflammatory effect of fixed oil of *Ocimum basilicum* Linn. *Indian Journal of Experimental Biology*. 37, 248-52.
- Singh, U.**, Tabibian, J., Venugopal, S. K., Devaraj, S. y Jialal, I. 2005. Development of an *in vitro* screening assay to test the antiinflammatory properties of dietary supplements and pharmacologic agents. *Clinical Chemistry*. 51, 2252-6.

- Siró, I.**, Kápolna, E., Kápolna, B. y Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. A review. *Appetite*. 51, 456-467.
- Skalen, K.**, Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hultén, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L. y Boren, J. 2002. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 417, 750-754.
- Skalicka-Wozniak, K.** y Glowiniak, K. 2012. Pressurized liquid extraction of coumarins from fruits of *Heracleum leskowsii* with application of solvents with different polarity under increasing temperature. *Molecules*. 17, 4133-4141.
- Smiderle, F. R.**, Ruthes, A. C., van Arkel, J., Chanput, W., Iacomini, M., Wichers, H. J. y Van Griensven, L. J. L. D. 2011. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11, 58.
- Sneharani, A. H.**, Singh, S. A. y Appu Rao, A. G. 2009. Interaction of alphaS1-casein with curcumin and its biological implications. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 57, 10386-91.
- Soler-Rivas, C.**, Marín, F. R., Santoyo, S., García-Risco, M. R., Señoráns, F. J. y Reglero, G. 2010. Testing and enhancing the *in vitro* bioaccessibility and bioavailability of *Rosmarinus officinalis* extracts with a high level of antioxidant abietanes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 1144-1152.
- Soliman, K. M.** y Badeaa, R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1669-1675.
- Soltoft, M.**, Christensen, J. H., Nielsen, J. y Knuthsen, P. 2009. Pressurised liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation. *Talanta* 80, 269-278.
- Sparmann, A.** y Bar-Sagi, D. 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 6, 447-458.
- Steinbrecher, U. P.** 1987. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *The Journal of Biological Chemistry*. 262, 3603-3608.
- Surh, Y. J.**, Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K. y Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research*. 480-481, 243-268.
- Tajkarimi, M. M.**, Ibrahim, S. A. y Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21, 1199-1218.
- Takahashi, M.**, Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y. y Wada, K. 2009. Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 9141-9146.
- Takashiba, S.**, Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A. W. y Shapira, L. 1999. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor- κ B. *Infection and Immunity*. 67, 5573-5578.

- Takisawa, R.**, Nishitani, Y., Mizuno, M. y Osawa, R. 2009. Anti-inflammatory effect of *Bifidobacterium longum* on macrophage-like THP-1 cells via epithelial cell Caco-2. *Bioscience and Microflora*. 28, 45-48.
- Taylor, P. R.**, Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G. D. y Gordon, S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review Immunology*. 23, 901-944.
- Teng, Z.**, Luo, Y. y Wang, Q. 2013. Carboxymethyl chitosan-soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*. 141, 524-532.
- Tietz, N. W.**, Rinker, A. D. y Shaw, L. M. 1983. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. 21, 731-48.
- Tu, Z.**, Moss-Pierce, T., Ford, P. y Jiang, T. A. 2013. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract regulates glucose and lipid metabolism by activating AMPK and PPAR pathways in HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 2803-2810.
- Ueki, Y.**, Miyake, S., Tominaga, Y. y Eguchi, K. 1996. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 23, 230-236.
- Ukkola, O.** y Santaniemi, M. 2002. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities?. *Journal of Molecular Medicine*. 80, 696-702.
- Vági, E.**, Rapavi, E., Hadolin, M., Vasarhelyine Peredi, K., Balazs, A., Blazovics, A. y Simandi, B. 2005a. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 17-21.
- Vági, E.**, Simándi, B., Suhajda, Á. y Héthelyi, É. 2005b. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*. 38, 51-57.
- van der Kraan, M.**, Fernandez Cid, M. V., Woerlee, G. F., Veugelers, W. J. T. y Witkamp, G. J. 2007. Dyeing of natural and synthetic textiles in supercritical carbon dioxide with disperse reactive dyes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 40, 470-476.
- Vega, M. A.** y Corbí, A. L. 2006. Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. *Inmunología*. 25, 248-272.
- Vera, R. R.** y Chane-Ming, J. 1999. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry*. 66, 143-145.
- Versantvoort, C. H.**, Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. y Sips, A. J. 2005. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chemistry Toxicology*. 43, 31-40.
- Vicente, G.**, García-Risco, M. R., Fornari, T. y Reglero, G. 2013. Isolation of carsonic acid from rosemary extracts using semi-preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 208-15.
- Vicente, G.**, Martín, D., García-Risco, M. R., Fornari, T. y Reglero, G. 2012a. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves for use in edible vegetable oils. *Journal of Oleo Science*. 61, 689-97.

- Vicente, G.**, Molina, S., González-Vallinas, M., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G. y de Molina, A. R. 2012b. Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *The Journal of Supercritical Fluids*. 79, 101-108.
- Vigo, E.**, Cepeda, A., Gualillo, O. y Perez-Fernandez, R. 2004. *In-vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*. nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56, 257-263.
- Villanueva, D.**, Luna, P., Manic, M., Najdanovic-Visak, V. y Fornari, T. (2011). Extraction of caffeine from green coffee beans using ethyl lactate. 9th Green Chemistry Conference. Alcalá de Henares, España
- Wan, J. M.-F.**, Sit, W.-H., Lee, C.-L., Fu, K. H.-M. y Chan, D. K.-O. 2006. Protection of lethal toxicity of endotoxin by *Salvia miltiorrhiza* BUNGE is via reduction in tumor necrosis factor- α release and liver injury. *International Immunopharmacology*. 6, 750-758.
- Wang, L.** y Weller, C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science Technology*. 17, 300-312.
- Wang, Q.**, Xia, M., Liu, C., Guo, H., Ye, Q., Hu, Y., Zhang, Y., Hou, M., Zhu, H., Ma, J. y Ling, W. 2008. Cyanidin-3-O- β -glucoside inhibits iNOS and COX-2 expression by inducing liver X receptor alpha activation in THP-1 macrophages. *Life Sciences*. 83, 176-184.
- Wang, Y.**, Gamage, J. y Zhang, Z. 2011. Separation of taxanes from *Taxus canadensis* using dynamic pressurized liquid extraction. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16, 769-776.
- Wasaporn, C.**, Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J. y Wichers, H. J. 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food & Function*. 1, 254.
- Wilkinson, P.**, Leach, C., Ah-Sing, E. E., Hussain, N., Miller, G. J., Millward, D. J. y Griffin, B. A. 2005. Influence of α -linolenic acid and fish-oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Atherosclerosis*. 181, 115-124.
- William, K. M.**, Dulcie, A. M. y Mark, W. R. 1996. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*. 7, 1-15.
- Wu, G.** y Meininger, C. J. 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annual Review of Nutrition*. 22, 61-86.
- Wyss-Coray, T.** 2006. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?. *Nature Medicine*. 19, 1005-1015.
- Xie, C.**, Kang, J., Chen, J.-R., Nagarajan, S., Badger, T. M. y Wu, X. 2011. Phenolic acids are *in vivo* atheroprotective compounds appearing in the serum of rats after blueberry consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 10381-10387.
- Xu, H.**, Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. y Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 112, 1821-1830.
- Xu, S.**, Liu, Z., Huang, Y., Le, K., Tang, F., Huang, H., Ogura, S., Little, P. J., Shen, X. y Liu, P. 2012. Tanshinone II-A inhibits oxidized LDL-induced LOX-1 expression in macrophages by

reducing intracellular superoxide radical generation and NF-kappaB activation. *Translational Research*. 160, 114-24.

Xue, X. H., Lai, K. T. A., Huang, J. F., Gu, Y., Karlsson, L. y Fourie, A. 2006. Anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* of the protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 317, 53-60.

Yadav, N. P., Khatri, R., Bawankule, D. U., Pal, A., Shanker, K., Srivastava, P., Gupta, A. K. y Chanda, D. 2009. Topical anti-inflammatory effects of *Ocimum basilicum* leaf extract in the phorbol-12,13-dibutyrate model of mouse ear inflammation. *Planta Medica*. 75, 923-923.

Yan, H., Wang, L., Li, X., Yu, C., Zhang, K., Jiang, Y., Wu, L., Lu, W. y Tu, P. 2009. High-performance liquid chromatography method for determination of carnosic acid in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 23, 776-81.

Yancey, P. G. y Jerome, W. G. 1998. Lysosomal sequestration of free and esterified cholesterol from oxidized low density lipoprotein in macrophages of different species. *Journal of Lipid Research*. 39, 1349-1361.

Yang, F., Shi, H., Zhang, X., Yang, H., Zhou, Q. y Yu, L. L. 2013. Two new saponins from tetraploid jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), and their anti-inflammatory and alpha-glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry*. 141, 3606-13.

Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X. y Singh, H. 2009. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International*. 42, 1093-1098.

Young, S. P., Kapoor, S. R., Viant, M. R., Byrne, J. J., Filer, A., Buckley, C. D., Kitas, G. D. y Raza, K. 2013. The impact of inflammation on metabolomic profiles in patients with arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 65, 2015-2023.

Yu, H., Kortylewski, M. y Pardoll, D. 2007. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Review Immunology*. 7, 41-51.

Yu, H., Pardoll, D. y Jove, R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Review Cancer*. 9, 798-809.

Yu, M. H., Choi, J. H., Chae, I. G., Im, H. G., Yang, S. A., More, K., Lee, I. S. y Lee, J. 2013. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*. 136, 1047-1054.

Yudkin, J. S., Stehouwer, C. D., Emeis, J. J. y Coppack, S. W. 1999. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 19, 972-978.

Zaibunnisa, A. H., Norashikin, S., Mamot, S. y Osman, H. 2009. An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurised liquid extraction (PLE). *Food Science and Technology*. 42, 233.

Zhang, C. 2008. The role of inflammatory cytokines endothelial dysfunction. *Basic Research Cardiology* 103, 398-406.

Zhang, L., Ravipati, A. S., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Smith, P. T., Bartlett, J., Shanmugam, K., Münch, G. y Wu, M. J. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities

of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 12361-12367.

Zhang, Y., Guo, L.-H. y Li, Y. 2013. Effect of Ebosin on the inflammatory cytokines in THP-1 cells. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 48, 661-7.

Zhang, Y., Lian, F., Zhu, Y., Xia, M., Wang, Q., Ling, W. y Wang, X.-D. 2010. Cyanidin-3-O-beta-glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing I kappa B alpha phosphorylation in THP-1 cells. *Inflammation Research*. 59, 723-730.

Zhong-qun, Y. y Göran, K. H. 2007. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunological Reviews* 219, 187-203.

Ziani, K., Fang, Y. y McClements, D. J. 2012. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: Vitamin E, vitamin D, and lemon oil. *Food Chemistry*. 134, 1106-1112.

Zimet, P., Rosenberg, D. y Livney, Y. D. 2011. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for omega 3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*. 25, 1270-1276.

Zuzarte, M., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A. y Salgueiro, L. 2013. Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*. 44, 97-103

